

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie végétale

Professeur H. GREPPIN

**ETUDE DE LA CHROMOGENESE
CHEZ
PSEUDOMONAS FLUORESCENS**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Mehrbanou MICHEA-HAMZEHPOUR

de

Chiraz (IRAN)

Thèse No 1611

Genève

MEDECINE ET HYGIENE

1973

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie végétale

Professeur H. GREPPIN

**ETUDE DE LA CHROMOGENESE
CHEZ
PSEUDOMONAS FLUORESCENS**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Mehrbanou MICHEA-HAMZEHPOUR

de

Chiraz (IRAN)

Thèse No 1611

Genève

MEDECINE ET HYGIENE

1973

La Faculté des Sciences, sur le préavis du professeur H. GREPPIN, directeur de thèse, et d'une commission composée des professeurs J. MIEGE, G. TURIAN, I. KAPETANIDIS et de MM. J. DESHUSSES et G. COMBEPINE, professeurs assistants, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 mars 1973

Le Doyen :

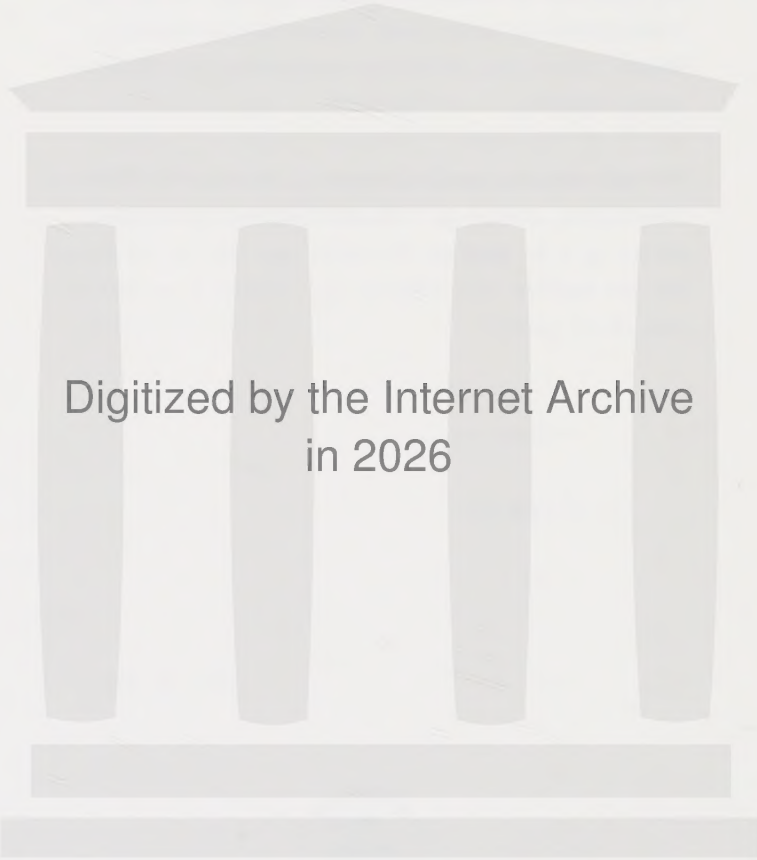
Jean MULLER

Thèse No. 1611



Que Monsieur le Professeur Hubert GREPPIN trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour ses conseils judicieux et ses encouragements tout au long de mon travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur A. HAMPAI du laboratoire central de l'Hôpital Cantonal de Genève. Enfin, je m'en voudrais d'oublier mes amis et collègues qui ont apporté leur aide et leur soutien à la réalisation de ce travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIERES

A/	INTRODUCTION	7
B/	MATERIEL ET METHODES	10
C/	RESULTATS :	

CHAPITRE I - Formation du complexe pigmentaire

1.	Distribution spécifique	16
2.	Conditions de la chromogénèse	17

CHAPITRE II - Rôle de la glycine et du succinate

1.	Choix des substrats	23
2.	Effet de la concentration en substrat nutritif	24
3.	Discussion	34

CHAPITRE III - Séparation du complexe pigmentaire

1.	Chronologie de l'isolement du complexe pigmentaire	36
2.	Séparation par filtration sur gel Sephadex G-15	40
3.	Discussion	46
4.	Traitement du surnageant des cultures chromogènes	48
5.	Caractéristiques des diverses fractions issues des milieux chromogène et achrome	50

CHAPITRE IV - Quelques différences entre les systèmes chromogène et achrome

1.	Métabolisme oxydatif	57
2.	Taux en ATP et en cytochrome au cours de la croissance	67
3.	Discussion	74

CHAPITRE V - Evolution du complexe pigmentaire

1. Apparition et évolution des fractions dans les milieu chromogène et achrome	76
2. Apparition et évolution des fractions du complexe pigmentaire en présence de substrats chromogènes radioactifs	85
2.1. Incorporation de l'acide succinique-2,3-C14	85
2.2. Incorporation de la glycine-2-C14	89
2.3. Discussion	92
3. Incorporation de l'acide Δ -aminolévulinique-4-C14	97
4. Relation entre les diverses fractions:	
4.1. Notion de dualité et d'unicité	101
4.2. Etude in vivo de la filiation	102
4.3. Discussion	103

CHAPITRE VI - Nature chromopeptidique

1. Quelques propriétés physico-chimiques de la pyoverdine	107
2. Analyses chimiques	109
3. Discussion	112

CHAPITRE VII - Respiration et rôle éventuel de la pyoverdine

1. Composition de la chaîne respiratoire	113
2. Variation qualitative et quantitative des cytochromes	114
3. La chaîne respiratoire terminale "cytochromique"	116
4. La chaîne respiratoire terminale "flavinique"	118
5. Discussion	119

D/ CONCLUSION GENERALE	120
E/ RESUME (en français et en anglais)	123
F/ BIBLIOGRAPHIE	128

A/ INTRODUCTION

La cellule vivante est un système complexe et intégré de milliers de processus cataboliques et anaboliques ne pouvant coexister de manière ordonnée sans l'action de mécanismes régulateurs.

Ces mécanismes régulateurs permettent la synthèse harmonieuse des produits nécessaires à l'expansion de la vie cellulaire et à sa survie. Ainsi, une cellule "idéale", par cet ajustement incessant, ne réaliserait jamais une surproduction de métabolite, quel que soit son environnement.

Pseudomonas fluorescens est un microorganisme s'adaptant facilement à l'offre du milieu et organisant son programme de développement selon les conditions mises à sa disposition.

L'adaptation des microorganismes aux changements du milieu se remarque entre autres choses par l'apparition ou la disparition de certains produits du métabolisme. La production d'un complexe pigmentaire exogène jaune-vert à fluorescence verte par *Pseudomonas fluorescens* en est un exemple. Elle répond à divers changements du milieu (potentiel rédox, pH, concentration en substrats, en oligoéléments, en oxygène, etc.).

Les études antérieures sur la chromogénèse chez *Pseudomonas fluorescens* ont mis en évidence des problèmes de nature diverse :

1. généétique :

Les travaux de Chodat, Wassilieff, 1951; El Sabeh, 1967; et Elfiki, 1968, ont permis d'éclaircir quelques connaissances sur le problème de la dissociation coloniale en forme rugueuse et lisse (R et S), ainsi que la possession par la forme rugueuse d'un génome responsable d'une meilleure production pigmentaire.

2. chimique :

Les tentatives de séparation et de purification ont été nombreuses : Turfitt, 1936; Turfreijer, 1941; Giral, 1936 ; Birkhofer et Birkhofer,

1948; Naves, 1955; Elliott, 1958; Gouda, 1966; Favre, 1969; Winters et Corpe, 1971. Le pigment n'a jamais été isolé et purifié en quantité suffisante pour que sa structure chimique puisse être établie. De nombreuses hypothèses ont été émises en faveur d'une structure ptérique, flavinique (Naves, 1955; Birkhofer et Birkhofer, 1948; Chakrabarty, 1964) et pyrrolique (Lenhoff, 1963; Gouda, 1966).

Baghdiantz (1953) a constaté que l'une des réactions de synthèse de la molécule à fluorescence jaune nécessite la présence de zinc. Ni le cuivre, ni le manganèse ne jouent de rôle à cet égard.

L'effet de certaines substances chromogènes a été mis en évidence par Lepierre, 1895; Sullivan, 1905; Blanchetière, 1920; Giral, 1936; King et al, 1948; Burton et al, 1948; Wolf, 1950; Wassilief, 1951; Chakrabarty, 1964; Gouda, 1966; Gouda et Greppin, 1965; Goswami et Majumdar, 1970.

Aucun précurseur direct n'a encore été identifié.

3. physiologique

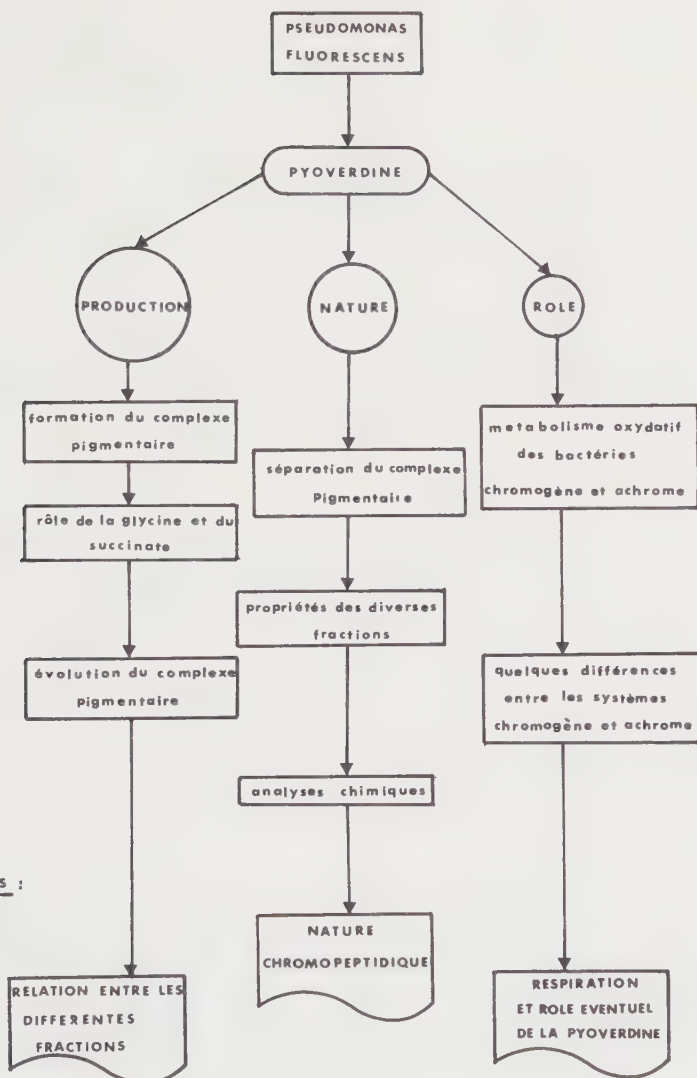
Les expériences de Chodat et Yakimach, 1946; Wolf, 1950; Gouda, 1966; Greppin, 1965; et El Sabeh, 1967; mettent en évidence les propriétés rédox du complexe pigmentaire et lui attribuent une fonction accessoire dans le système respiratoire.

Les recherches faisant l'objet de ce travail ont été entreprises dans le but précis, mais limité, d'étudier quelques aspects de la chromogénèse chez *Pseudomonas fluorescens*, souche B₅₂, concernant la production, la nature et le rôle éventuel du complexe pigmentaire.

SUJET :

OBJET :

QUESTIONS :



CONCLUSIONS :

PLAN DE LA RECHERCHE

B/ MATERIEL ET METHODES1. organisme :

Pseudomonas fluorescens souche B₅₂ (collection du département de Biologie végétale).

2. milieu :

Nous avons employé le milieu propice à la chromogénèse décrit par Turfreijer et al., (1941) appelé conventionnellement milieu W. C'est un milieu synthétique simple, de formule suivante :

Lactate d'ammonium	2 g
SO ₄ Mg, 7.H ₂ O	0.3 g
PO ₄ HK ₂	0.3 g
Eau distillée ad.	1000 ml

Le pH est ajusté à 7.3 par du NaOH à 10%.

Les cultures achromes ont été obtenues par enrichissement du milieu W (lactate d'ammonium 15 ‰ et citrate de fer 10⁻⁵M).

D'autres milieux synthétiques ont été utilisés:

PO ₄ HK ₂	0.3 g ‰
SO ₄ Mg, 7.H ₂ O	0.3 g ‰

avec selon les cas les substances suivantes : glycine, succinate de sodium, glyoxylate de sodium, acide δ-amino-lévulinique.

Tous ces milieux sont en général stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

3. inoculum :

Nous avons choisi un inoculum standard âgé de 72 heures (phase stationnaire : 10⁸ bactéries/ml). 0.05 ml d'une telle culture sont ajoutés à 50 ml de milieu nutritif.

4. méthodes de culture

- 4.1. Culture en système fermé : le milieu est réparti dans des Erlenmeyer de 150 ml contenant 50 ml de milieu. Les flacons inoculés et cultivés à 25°C sont soumis à une agitation mécanique continue.
- 4.2. Culture en système ouvert ou culture continue : les ballons de 2,5 litres, contenant 1 litre de milieu W sont inoculés avec 5 ml d'un inoculum standard. La régénération du milieu est réalisée par l'intermédiaire d'un dispositif à débit contrôlé (chimiostat). L'évacuation du surplus se fait par un mécanisme d'aspiration, maintenant un volume constant de 1 litre. Les ballons sont soumis à une agitation mécanique continue et à une température de 25°C.

5. techniques et analyses

- 5.1. Détermination de la croissance : l'estimation de la population bactérienne a été réalisée au début de nos travaux au néphélomètre de PULFRICH, puis par mesure turbidimétrique à 650 nm. avec un spectrophotomètre HITACHI modèle 101. Une courbe d'étalonnage a été établie en fonction de la concentration en protéines.
- 5.2. Détermination de la consommation d'oxygène : cette étude fut conduite au moyen de l'appareil de Warburg, selon les techniques manométriques classiques exposées par Umbreit, Burris et Stauffer (1964).

Une fiole de l'appareil, contenant 3 ml d'eau distillée, sert de thermobaromètre. Les milieux de culture sont centrifugés 10 minutes à 10,000 g (+4°C). Le culot bactérien est resuspendu dans 15 ml de tampon phosphate 10^{-1} M (pH 7.0). 2,3 ml de cette suspension ont été placés dans le compartiment principal de façon à avoir 10-20 mg de poids frais/récipient. 0.4 ml d'une solution de concentration 10^{-2} M de substrat oxydable sont ajoutés à la suspension bactérienne.

L'auge centrale contient 0.3 ml de KOH 20 %. Les fioles contiennent au total 3.0 ml de liquide. La température est maintenue à 25°C. La respiration endogène est mesurée uniquement en présence du tampon phosphate 0.1 M.

Les lectures sont poursuivies au minimum pendant 60 minutes, au maximum

pendant 120 minutes et sont effectuées toutes les 10 minutes. La quantité d'oxygène consommé est calculée en micromole/mg protéine/heure.

- 5.3. Séparation du complexe pigmentaire par filtration sur gel Sephadex G-15.: 50 ml de milieu de culture sont centrifugés pendant 10 minutes à 10,000 g (+4°C). Le surnageant est évaporé à sec, sous vide, à 60°C. Le résidu est repris dans 3 ml d'éluant $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$ ou dans de l'eau distillée, et filtré sur papier filtre Whatmann. Le filtrat est déposé sur une colonne à chromatographie "PHARMACIA" de 2,5 x 90 cm, remplie de gel Sephadex G-15, et élué au moyen d'une solution de $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$.

Par l'emploi d'une pompe péristaltique LKB, nous avons maintenu un débit constant de 18 ml/heure. L'évolution du fractionnement est suivie sur un enregistreur LKB relié à un Uvicorde II absorbant à 254 nm. Les fractions de 3 ml ont été collectées et examinées.

- 5.4. Marquage du complexe pigmentaire : les substances radioactives utilisées sont :

- . Acide succinique -2,3- C^{14} : 23 mCi/m mole
- . Glycine -2- C^{14} : 57 mCi/m mole
- . Acide -5-aminolévulinique-4- C^{14} (hydrochlorure) : 31 mCi/mole.

500 nCi de substance radioactive sont ajoutés à 50 ml de milieu nutritif et dilués par la même substance non marquée de façon à obtenir une concentration 10^{-4}M . (concentration finale en substrat identique, non radioactif : 10^{-4}M .).

Lorsque la séparation pigmentaire est réalisée, 2 ml de chaque fraction sont mis dans des fioles en plastique et 15 ml de liquide scintillant Davila et al., (1965) y ont été ajoutés.

L'activité isotopique est mesurée au scintillateur BECKMAN et NUCLEAR-CHICAGO isocap. Pour chaque fraction le % de "quenching" a été déterminé.

- 5.5. Dosage des éléments C, H et N : les fractions 3 et 4 lyophilisées ont été analysées pour leur contenu en C, H et N (Dr. K. Eder, laboratoire de microchimie, Université de Genève).

5.6. Dosage des acides aminés : 4 ml d'une fraction purifiée sur Sephadex G-15 sont évaporés à sec (sous vide et à froid), puis repris dans 2 ml d'eau bidistillée. On y ajoute 2 ml d'acide chlorhydrique concentré. L'oxygène est chassé de la solution par barbotement avec de l'azote pendant 3 minutes. Le tube est scellé immédiatement et mis à l'étuve pendant 15 à 96 heures à 110°C. L'hydrolysate est ensuite évaporé à sec, sous vide, pour éliminer l'acide chlorhydrique. Le résidu est repris dans 4 ml d'eau bidistillée. 2 ml de cette solution sont appliqués sur l'analyseur d'acides aminés BIOCAL 200 selon la méthode standard. Les acides aminés acides, neutres et basiques sont ainsi déterminés.

Cette analyse a été réalisée par M. A. Hampaï (laboratoire central de l'Hôpital Cantonal à Genève).

5.7. Electrophorèse : les essais électrophorétiques ont été réalisés
 a) au moyen d'un appareil ELPHOR, sous une tension de 110 volts, avec du papier Whatmann I, une solution de carbonate d'ammonium de pH 8.7 (la durée de migration est de 16-20 heures),
 b) au moyen de l'appareil CAMAG, sous tension de 5000 volts, avec du papier Schleicher & Schuell AG 2043 B mg1, une solution d'acide formique et d'acide acétique de pH 1.9 (la durée de migration est de 10 minutes).

5.8. la densité optique du pigment et le spectre d'absorption dans le visible et l'U.V. sont mesurés au spectrophotomètre UNICAM Sp 800 B.

5.9. la fluorescence est mesurée au fluorimètre PHOTOVOLT modèle 54 par l'emploi d'un filtre primaire N-Hg₂ (excitation à 405 nm). Les spectres d'émission et d'excitation d'une fraction purifiée ont été mesurés sur l'appareil CARL-ZEISS muni d'une source de Xénon.

5.10. les cytochromes sont estimés (cytochrome c) sur 3 ml d'une suspension bactérienne provenant de 120 ml de milieu de culture, d'après la méthode de Shibata-Calvin (1954). Les résultats sont rapportés au mg. de protéines, (D.O. à 551 nm/mg. protéines).

5.11. les protéines sont estimées par la méthode de Lowry (1951) au moyen du réactif Folin-Ciocalteu. 30 ml de milieu de culture sont centri-

-fugés à froid pendant 10 minutes, à 10,000 g. Le culot bactérien est mis en suspension dans 5 ml de tampon phosphate 1/15 M, puis ultrasonné (Ultrasonic Power Unit, MSE) durant 1 à 3 minutes à froid. 5 ml d'acide trichloracétique 10 % sont ensuite ajoutés à la suspension ultrasonnée. Après précipitation des protéines on centrifuge 10 minutes à 10,000 g (+4°C). Le précipité est alors dissous dans 1 ml de NaOH 10%. Cette solution est prête pour le dosage selon Lowry.

Les résultats sont exprimés par rapport à une solution étalon de Bovin Serum Albumin (BSA) en microgrammes de protéines par millilitres de culture.

- 5.12. l'Adénosine-Triphosphate (ATP) est mesurée par l'emploi de la Luciférase selon la méthode de Strehler (1965). Le milieu de culture contenant les bactéries est centrifugé et lavé deux fois avec 5 ml de tampon phosphate 6×10^{-3} M. Le surnageant est éliminé par une aspiration, puis le culot bactérien est mis en suspension avec 1 ml de H_2SO_4 3×10^{-1} M. On agite bien avec une baguette en verre, puis on laisse la suspension 30 minutes à froid. On neutralise ensuite avec du NaOH N pour obtenir un pH 6 à 8. Le volume est ensuite complété à 5 ml avec de l'eau bidistillée, dans un tube gradué. On centrifuge ensuite 10 minutes à 20,000 g à froid. Le surnageant obtenu est prêt pour les mesures.

Une solution d'ATP de 2 mg est utilisée en tant qu'étalon. Avant chaque dosage d'ATP, il faut déterminer la quantité d'extrait de Luciférase nécessaire pour produire une luminescence de 50 %. On ajuste l'appareil à 50 %. Nous avons effectué ce dosage au moyen de l'appareil PHOTOVOLT modèle 54.

6. origine des produits chimiques :

Les produits utilisés sont de diverses provenances :

- . PACKARD : Popop
- . SIGMA : Firefly lanterns (dessicated tails)
Tampon d'arséniate de Na 0.1 M à pH 7.4
Bovin Serum Albumin
- . RADIOCHEMICAL CENTER AMERSHAM :
Acide succinique-2,3-C14
Glycine-2-C14
Acide 5-aminolévulinique-4-C14
- . PHARMACIA : Sephadex G-15
- . K & K Laboratories, Inc. : Lactate d'ammonium, 80 %.

Les autres produits sont fournis par MERCK et FLUKA.

C/ RESULTATS

CHAPITRE I

FORMATION DU COMPLEXE PIGMENTAIRE

1. Distribution spécifique

Pseudomonas fluorescens est une bactérie mobile aérobie, gram négatif, aspore, en forme de bâtonnet mesurant 1 à 2 μ de longueur. Cette bactérie appartient au groupe des Pseudomonadales fluorescentes, qui a été décrit pour la première fois en 1886 par Flügge.

Selon la classification de Stanier, Doudoroff et Palleroni (1966), les Pseudomonodacées fluorescentes comprennent trois espèces :

- . *Ps. aeruginosa*
- . *Ps. putida*
- . *Ps. fluorescens*

D'après Rhodes (1959, 1961), il est difficile de distinguer nettement *Ps. putida* de *Ps. fluorescens*. Les trois groupes produisent des pigments hydrosolubles. Gessard (1891) avait déjà mentionné que dans les milieux de cultures de *Ps. aeruginosa*, la pyocyanine est presque toujours associée à un pigment vert fluorescent.

Les Pseudomonodacées fluorescentes produisent un complexe pigmentaire jaune-vert à fluorescence verte et bleue, de structure chimique inconnue. Ce complexe est connu sous les dénominations suivantes : pyoverdine, fluoresceïne bactérienne, fluorescine, et pigment vert de *Ps. fluorescens*. Le terme pyoverdine a été utilisé par Turfmeijer (1941) en analogie avec la pyocyanine, pigment phénazinique produit par *Ps. aeruginosa*.

Ps. fluorescens est formé de sept biotypes (Stanier et coll., 1966), dont trois produisent des pigments de nature phénazinique : *Ps. chlororaphis*, *Ps. aureofaciens* et *Ps. lemmonieri*. Les autres biotypes ne produisent pas de tels pigments. Notre souche appartient à ces derniers.

La synthèse de pyoverdine est fortement influencée par les facteurs nutritifs (Wolf, 1950; Naves, 1955; Gouda, 1966; Gouda et Greppin, 1965).

Dans certaines conditions du milieu, même en présence d'une bonne croissance, le pigment peut manquer totalement (Stanier et coll. 1966). Jusqu'ici on n'a jamais pu établir si le pouvoir de synthèse du pigment est lié aux autres caractères des Pseudomonadacées fluorescentes, liaison qui justifierait la classification de ces bactéries dans un groupe particulier.

Les propriétés générales de *Ps. fluorescens* ont été énumérées par Wolf (1950) ainsi que par Stanier, Doudoroff, Palleroni (1966). Nous ne nous y attarderons pas.

2. Conditions de la chromogénèse

L'étude de la production du complexe pigmentaire est l'objet de recherches depuis fort longtemps. Wolf (1950) décrit en détail les conditions physico-chimiques favorables à la formation de ce pigment. Nous citerons brièvement quelques facteurs essentiels :

- 2.1. la lumière : la lumière, à faible intensité, exerce une action sur l'évolution du complexe pigmentaire et sur son accumulation dans le milieu de culture. A l'obscurité, le pigment reste essentiellement à l'état réduit. Greppin et Gouda (1965) ont montré que la production de pigment est stimulée par la lumière bleue. Greppin (1965) note l'oxydation accélérée de la pyoverdine par la lumière blanche ou bleue. Lorsque l'intensité de celle-ci est trop forte, il y a photo-destruction et arrêt du fonctionnement du pigment.
- 2.2 la température : *Ps. fluorescens* est une bactérie psychrophile qui se développe bien à 4°C. La température optimale de croissance et de formation du pigment est de 25°C. Au-dessus de 28-30°C, nous n'avons plus de formation de pigment et la bactérie se développe mal. Garibaldi (1971) pense que l'incapacité de cette bactérie de croître à une température élevée est due au manque de formation des transporteurs enzymatiques du fer. Selon Rose (1962) l'incapacité des bactéries psychrophiles de se développer au-dessus de 30°C est due à l'accumulation de produits métaboliques toxiques.

D'une façon générale, chez les psychrophiles, certains enzymes doivent être thermolabiles. Selon Farrell et Rose (1967), la tempéra-

-ture influence leur synthèse et non pas leur activité.

- 2.3. l'oxygène : il n'existe probablement aucun micro-organisme indifférent à la présence d'oxygène. Pour beaucoup, il est indispensable à leur vie; pour certains, il est toxique même en très petite quantité. Chez d'autres, il provoque des changements fondamentaux dans le métabolisme cellulaire. Le mécanisme des réponses à l'oxygène est encore obscur.

Chez *Ps. fluorescens* la pigmentogenèse est proportionnelle au degré d'aération des milieux de culture (Lenhoff et Kaplan, 1956; Lenhoff, 1963). Lorsque la tension d'oxygène augmente, le taux des cytochromes diminue. Le contenu en catalase et en peroxydase baisse aussi (Lenhoff et Kaplan, 1956; Greppin et Gouda, 1972).

Klebsiella aerogenes produit un pigment jaune sous une forte tension d'oxygène, ce dernier disparaît lorsque la pression d'O₂ diminue (Harrison et coll., 1969).

La production de pigment sous forte tension d'oxygène est chez *Ps. fluorescens* une indication de changement dans les voies métaboliques. Les produits formés sous aérobiose ou anaérobiose nous renseignent sur l'effet de l'oxygène. La variation de la pression d'oxygène provoque un changement qualitatif et quantitatif du système cytochromique d'*Aerobacter aerogenes*, Moss (1956) et de *Haemophilus parainfluenza*, White (1963). Collins et Lascelle (1962) notent que l'équipement enzymatique des cultures aérobies est différent de celui des cultures anaérobies.

En conclusion, l'oxygène apparaît chez *Ps. fluorescens* comme un inhibiteur de la synthèse des cytochromes et un activateur de la formation de pyoverdine (Lenhoff et Kaplan, 1956; Lenhoff, 1963).

- 2.4. le rôle des métaux : Burton et al. (1948), King et al. (1948), Totter et Moseley (1953) ont étudié chez *Ps. aeruginosa* la stimulation de la production de pigment par l'addition de métaux. L'effet activateur ou inhibiteur d'un métal est fonction de sa nature et de sa concentration dans le milieu.

Georgia (1931) note le rôle indispensable du magnésium dans la production du pigment vert hydrosoluble. Baghdiantz (1953) et Chakrabarty (1964) montrent le rôle catalyseur du zinc dans la fluoresceinogenèse. Naves (1955) remarque que le zinc devient efficace lorsqu'il agit en synergie avec le magnésium. Lenhoff et Kaplan (1956) notent l'importance du taux en molybdène dans les cultures chromogènes.

Le fer joue le rôle principal dans l'inhibition de la synthèse de pyoverdine et la stimulation des cytochromes (Lenhoff, 1963). Lorsque sa concentration dans le milieu est faible, les pigments héminiques ne se forment plus et nous avons par contre une forte production de pigment jaune-vert. Même dans des milieux riches en substrat nutritif, lorsque la concentration de lactate d'ammonium (15 ‰) est constante, l'addition des différentes doses de fer ferreux provoque une variation en cytochrome et en pigment jaune-vert. Dans les milieux achromes, la synthèse de protéines et la multiplication cellulaire sont fortement stimulées (cf. tableau 1.)

Tableau 1. - Action de la concentration en fer sur la production de pigment et de cytochrome c (milieu lactate 15 ‰)

Fer ⁺⁺	Croissance D.O. à 650 nm.	Cytochrome C D.O. à 551 nm.	Pigment D.O. à 410 nm.
5x10 ⁻⁸ M	0.660	0.04	1.100
1x10 ⁻⁷ M	0.690	0.04	1.090
3x10 ⁻⁷ M	0.720	0.045	0.540
5x10 ⁻⁷ M	0.730	0.050	0.300
7x10 ⁻⁷ M	0.720	0.090	0.240
1x10 ⁻⁶ M	0.720	0.110	0.200
5x10 ⁻⁶ M	0.870	0.210	0.080

Chez certaines bactéries, le fer est le régulateur de la synthèse des pigments héminiques (cytochromes, catalases, peroxydases), et la carence en ce métal provoque une accumulation des porphyrines libres dans le milieu (Lascelle, 1961).

Toutefois, il semble qu'une très faible concentration en fer soit une condition absolue pour la production du pigment jaune-vert à fluorescence verte (King et al., 1948; Totter et Moseley, 1953; Lenhoff et Kaplan, 1956; Johnstone, 1959; Bulen et Le Comte, 1962; Love et Hulcher, 1964; Palumbo, 1972).

- 2.5. pH du milieu : la formation et l'activité des enzymes sont sous la dépendance de pH. Un milieu alcalin (pH 7.2 à 7.8) favorise l'apparition de la pyoverdine. Dans un milieu à pH fixe (6.8), le pigment vert ne se forme pas. Il y a une accumulation de pigment verdâtre à fluorescence bleue intense.
- 2.6. effet des substrats carbonés et azotés : l'introduction dans le milieu de culture de substances constituant des sources uniques de carbone et d'azote, détermine une production pigmentaire variable selon la nature et la concentration des composés utilisés (Greppin et Gouda, 1965). Ces substances peuvent être divisées en deux groupes : a) chromogènes, b) antichromogènes.
 - a) les essais préliminaires avec divers substrats chromogènes nous fournissent les renseignements suivants : en 1895, Lepierre montra l'importance de la nature des composés carbonés. Cet auteur attribua le rôle accélérateur à la dibasicité des acides organiques, ainsi qu'à l'existence d'au moins deux groupes méthylène dans leur molécule. Sullivan (1905), montra l'importance des groupes carboxyles et méthylène. Blanchetière (1920) étudia l'effet très favorable de l'asparagine. Il observa une scission aminooxydasique avec un dégagement important de NH_3 . La plupart des auteurs ont remarqué que le radical ammoniacal, lié aux acides organiques, constitue une source d'azote excellente pour la chromogénèse. Giral (1936) nota l'effet chromogène du succinate en présence du chlorure d'ammonium.

Les acides glutamique et succinique provoquent une augmentation de la production pigmentaire chez *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* (Osawa et coll., 1963; Gouda, 1966).

- b) parmi les substances antichromogènes, Wolf (1950) observa l'effet du glucose. La glycolyse produit une acidification considérable du milieu (pH 4.8). Pareille acidité s'oppose à l'accumulation visible des pigments de *Ps. fluorescens*. Wolf (1950) observe la même inhibition lors de l'utilisation d'un milieu tamponné. Dans la littérature, l'effet inhibiteur du glucose sur l'activité et la synthèse de certains enzymes est connu. Marver et Tschudy (1966) envisagent l'inhibition par le glucose de la synthèse d'ARN messenger, qui tient sous sa dépendance la formation de certains enzymes.

L'effet inhibiteur du glyoxylate a été mis en évidence par Gouda (1966). Selon cet auteur, l'effet inhibiteur du glyoxylate est lié à l'intégrité de cette molécule. Les divers produits de dégradation de cette substance ne possèdent aucun effet antichromogène.

L'effet hypochrome de la glycine est dû à son produit d'oxydation, le glyoxylate (Gouda, 1966).

Parmi les substances azotées, les ions nitrates entravent fortement la synthèse de pigment et induisent la formation des cytochromes.

- 2.7. rapport oxygène/substrat : lors de l'utilisation de lactate d'ammonium comme unique source de carbone et d'azote, sous pression atmosphérique, une concentration de 2 % favorise la chromogénèse et une concentration de 15 % stimule la synthèse des cytochromes (Gouda, 1966; Greppin et Gouda, 1965).

Selon Greppin et Gouda (1972), le rapport de la pression partielle d'O₂ à la concentration en substrat nutritif, règle l'orientation qualitative et quantitative de l'alternative respiratoire. A un rapport supérieur à environ 3 (O/S>3), la synthèse de pigment jaune-vert à fluorescence verte est favorisée; en dessous de ce rapport, cette même synthèse est inhibée, alors que celle des protéines est fortement stimulée.

D'autre part, la vitesse de variation de la quantité des bactéries joue un rôle important dans l'action du rapport comburant/carburant.

3. Conclusion

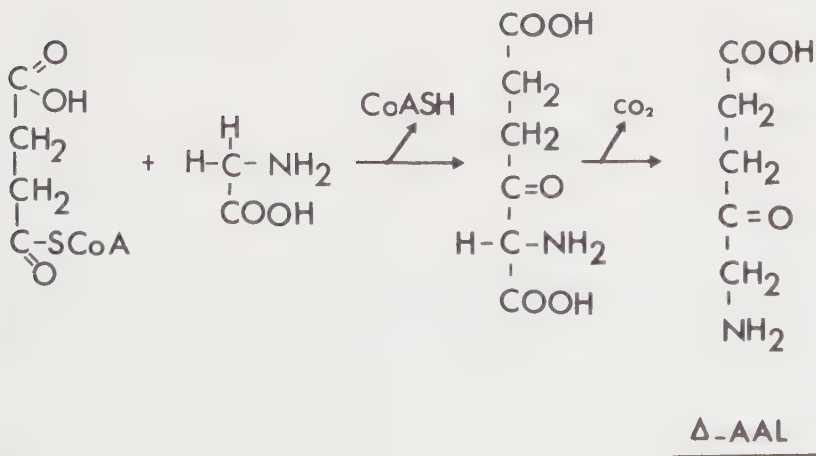
Pour obtenir une bonne chromogénèse, il faut que le milieu de culture soit riche en oxygène et déficient en fer; d'autre part, la nature du substrat nutritif ainsi que sa concentration ont une influence importante. Les métaux Mg^{++} , Zn^{++} et Mo^{++} sont indispensables à l'apparition de la couleur jaune-vert (Gouda, 1966; Baghdiantz, 1953; Lenhoff et Kaplan, 1956).

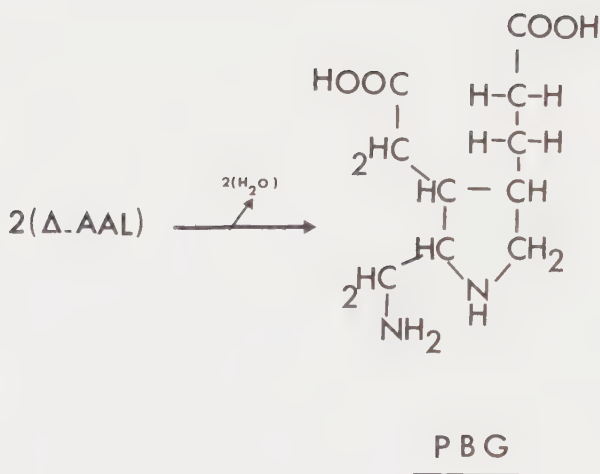
CHAPITRE II

ROLE DE LA GLYCINE ET DU SUCCINATE1. Choix des substrats

Le choix de la glycine et du succinate a eu pour motivation le travail de Gouda (1966). Cet auteur attribue un effet hypochromogène à la glycine, hyperchromogène au succinate et, d'autre part, propose l'existence de noyau pyrrolique dans le complexe pigmentaire. Cette dernière hypothèse est corroborée par le travail de Lenhoff (1963).

La glycine et le succinate, précurseurs directs des noyaux pyrroliques, sont utilisés en rapport équimoléculaire. Le produit de leur réaction est un acide instable qui se transforme en acide δ -aminolévulinique (δ -AAL). La condensation de deux molécules de δ -AAL sous l'action de la δ -AAL déshydratase fournit le premier noyau pyrrolique appelé porphobilinogène (PBG).





Le mécanisme de la synthèse des pyrroles a été étudié par Shemin et al. en 1955.

Si le pigment de *Ps fluorescens* contient le noyau pyrrolique, la glycine doit être, pour le moins, une molécule chromogène. Nous avons essayé d'éclaircir ce problème ainsi que, parallèlement, celui du rôle du succinate et du glyoxylate, cette dernière molécule étant hypochromogène (Gouda, 1966).

2. Effet de la concentration en substrat nutritif

La concentration en substrat nutritif occupe une place importante dans la régulation de la synthèse en pyoverdine (Gouda et Greppin, 1965). Ces auteurs définissent un indice de production pigmentaire (IPp) comme étant le reflet d'un état physiologique lié à la respiration bactérienne. Cet indice permet de suivre la cinétique de l'investissement du substrat sous forme de pigment et autres composés, produits du métabolisme bactérien.

L'analyse des indices pigmentaires donnés par Gouda (1966), nous révèle que la concentration en glycine utilisée est bien supérieure à celle du succinate et que l'effet hypochrome de cet acide aminé se manifeste surtout à de fortes doses (effet de concentration). Nous remarquons qu'à une concentration équimoléculaire, la production pigmentaire, dans le cas de la glycine,

est égale, voire même supérieure à celle du succinate. Donc ces deux molécules sont chromogènes.

Nous avons examiné l'action de la glycine en présence de sels d'acides minéraux et organiques. Les différentes combinaisons de milieux utilisés sont les suivantes :

- I. -Glycine 10^{-2} à 10^{-3} M
- II. -Glycine " + NO_3NH_4 2.10^{-2} M
- III. -Glycine " + Lactate de sodium 2.10^{-2} M
- IV. -Glycine " + Succinate de sodium 10^{-1} à 10^{-2} M
- V. -Glycine " + Lactate d'ammonium 5.10^{-3} M
- VI. -Succinate de sodium 10^{-1} à 10^{-2} M + Lactate d'ammonium 5.10^{-3} M
- VII. -Glycine 10^{-2} à 10^{-3} M + Succinate de sodium 10^{-1} à 10^{-2} M + Lactate d'ammonium 5.10^{-3} M
- VIII. -Glycine + Succinate de sodium + Lactate de sodium 5.10^{-3} M
- IX. -Lactate d'ammonium 5.10^{-3} M
- X. -Succinate de sodium 10^{-1} à 10^{-2} M + NO_3NH_4 2.10^{-2} M
- XI. -Glycine 10^{-2} à 10^{-3} M + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ $1,5.10^{-2}$ M
- XII. -Succinate de sodium 10^{-1} à 10^{-2} M + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ $1,5.10^{-2}$ M
- XIII. -Succinate de sodium 10^{-1} à 10^{-2} M + Glyoxylate 10^{-1} à 10^{-2} M + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ $1,5.10^{-2}$ M

La croissance bactérienne a été suivie par la mesure de l'indice néphélo-métrique. La densité optique du pigment et la concentration en protéines ont été estimées à la fin des phases logarithmiques de croissance.

L'indice de production pigmentaire (IPp) défini par Gouda et Greppin (1965) a été calculé selon la formule :

$$\text{IPp} = \frac{\text{Pigment (D.O. 400-420 nm)}}{\text{Protéines mg/ml (milieu de culture)}}$$

A la suite de ces résultats (Tableau 2 et Fig. 1), les conclusions que nous tirons sont les suivantes :

2.1. Lorsque la glycine est la seule source de carbone et d'azote, la croissance de *Ps. fluorescens* est inhibée. Cette bactérie est incapable dans ce cas de métaboliser cet acide aminé (ceci dans une période limitée à 5 jours).

2.2 Lorsque la glycine est en présence de nitrate d'ammonium, il y a également une inhibition de la croissance. Le cas identique a été observé pour le glyoxylate.

La glycine et le glyoxylate, composés à deux carbones, semblent rencontrer une barrière de perméabilité (manque de perméase spécifique ?). L'apparition d'un léger trouble après une semaine est peut être l'indice d'un tel phénomène.

2.3. Lorsque le nitrate est remplacé par le sulfate d'ammonium, une très légère croissance a lieu sous forme d'amas granulés. L'examen au microscope électronique montre une déformation et une lyse de l'enveloppe cellulaire.

2.4. Le comportement de la glycine en présence de lactate de sodium est bien différent. Si le carbone provient bien des deux composés, l'azote au contraire est fourni uniquement par la glycine. *Ps. fluorescens* se développe très bien dans ce milieu.

Cette expérience met clairement en évidence le fait suivant, à savoir que : la glycine est métabolisée en présence d'un acide organique.

Kaback et Stadtman (1968) ont montré que le succinate stimulait l'utilisation de la glycine chez *E. coli*

Nous avons constaté une bonne croissance, accompagnée d'une pigmentation, lorsque la glycine et le succinate de sodium forment la seule source de carbone et d'énergie (Fig. 2). Toutefois, la productivité en protéines est nettement plus forte en présence de glycine, alors que la productivité en pigment est largement plus marquée en présence de succinate.

- 2.5. L'addition de lactate d'ammonium 0.5 % aux milieux contenant de la glycine et du succinate stimule la biosynthèse du pigment (synergisme). L'indice de production pigmentaire s'élève à 15.3 contre 6.2 sans ammonium (Fig. 3). Le rapport de concentration des deux substrats glycine, succinate, est indépendant de la présence ou de l'absence du lactate.
- 2.6. La glycine et le succinate sont deux molécules chromogènes. L'indice de production pigmentaire est presque identique (Fig.4).
- 2.7. Le glyoxylate inhibe la chromogénèse et stimule la croissance (protéines) (Fig. 5).

Tableau 2. - Effet de différents substrats sur la chromogénèse et la production en protéines.

No.	Conditions	Pigment D.O.	Protéines mg.10 ⁻³ /ml	IPp
I	Glycine	0	0*	0
II	Glycine + NO ₃ NH ₄	0	0*	0
III	Glycine + Lactate de Na	0.740	290.4	2.5
IV	Glycine + Succinate de Na	1.060	172.0	6.2
V	Glycine + Lactate d'ammonium	0.828	197.2	4.2
VI	Succinate de Na + Lactate d'ammonium	0.990	220.5	4.5
VII	Glycine + Succinate de Na + Lactate d'ammonium	>2.0**	237.5	15.3
VIII	Glycine + Succinate de Na + Lactate de Na	0.638	276.3	2.3
IX	Lactate d'ammonium	0.235	94.83	2.4
X	Succinate de Na + SO ₄ (NH ₄) ₂	0.588	66.9	8.8
XI	Glycine + SO ₄ (NH ₄) ₂	0	±	0
XII	Succinate de Na + NO ₃ NH ₄	0.690	156.0	4.4
XIII	Succinate de Na + Glyoxylate + SO ₄ (NH ₄) ₂	0.334	122.4	2.7

Cultures fermées et agitées à 25°C.

* légère croissance après une semaine

** une dilution a été faite pour mesurer la D.O., et IPp a été multiplié par le facteur de dilution

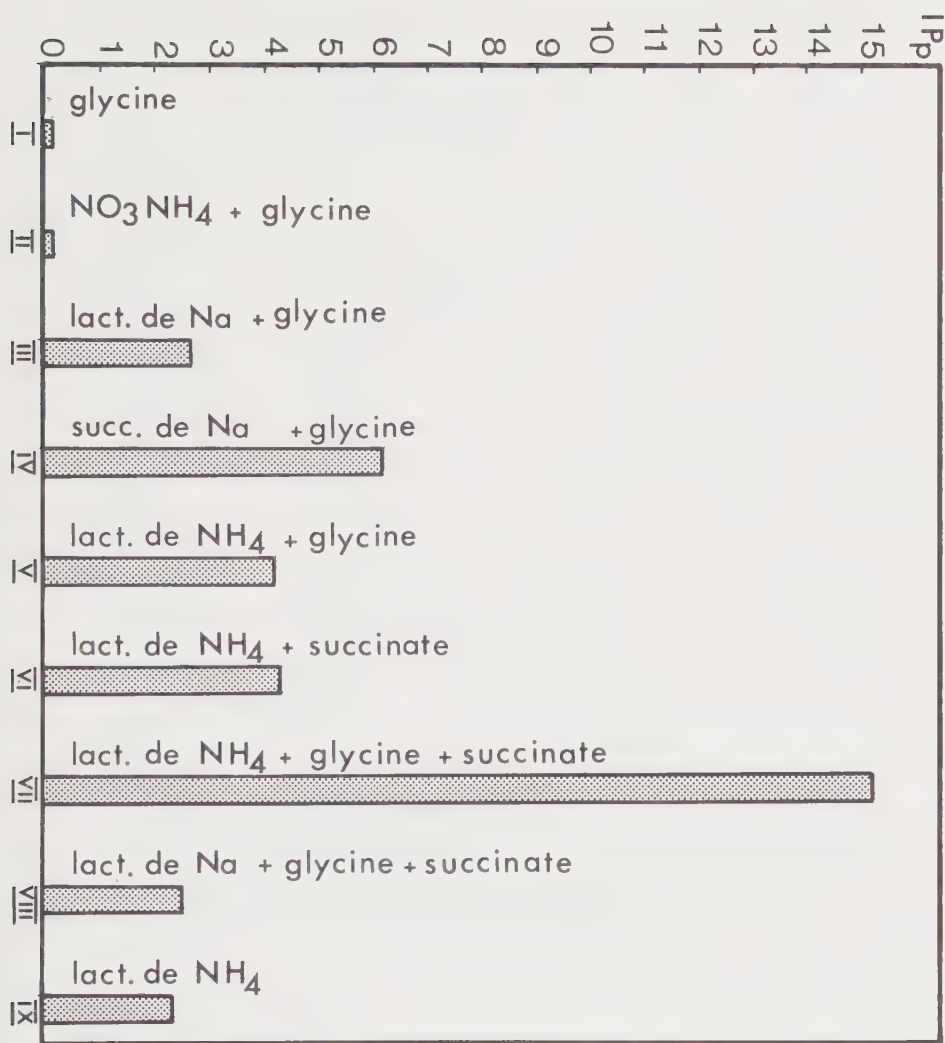


Fig. 1

Rôle de différents substrats sur la production pigmentaire

IPp = indice de production pigmentaire

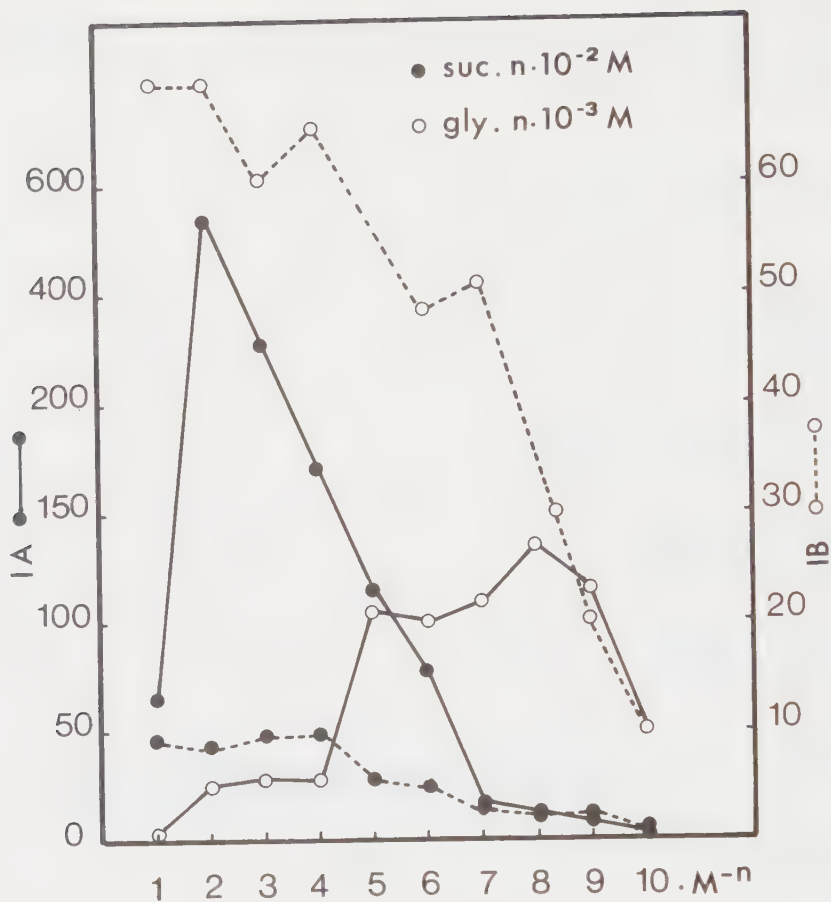


Fig. 2

Evolution des indices de productivité en pigment et en protéine en fonction de la concentration de glycine et de succinate.

$$\bullet - \bullet, IA = \frac{\text{D.O. du pigment (400-420 nm)}}{[\text{substrat}]}$$

$$\circ - - - \circ, IB = \frac{\text{mg protéines/ml de milieu de culture}}{[\text{substrat}]}$$

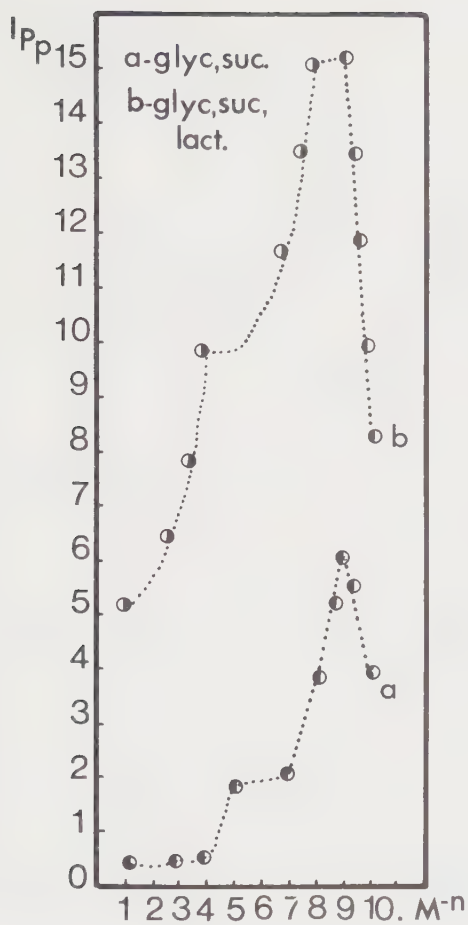


Fig. 3

Production pigmentaire :

a) en présence de glycine ($n.10^{-3}M$) et de succinate ($n.10^{-2}M$)

b) idem + lactate d'ammonium ($5.10^{-3}M$)

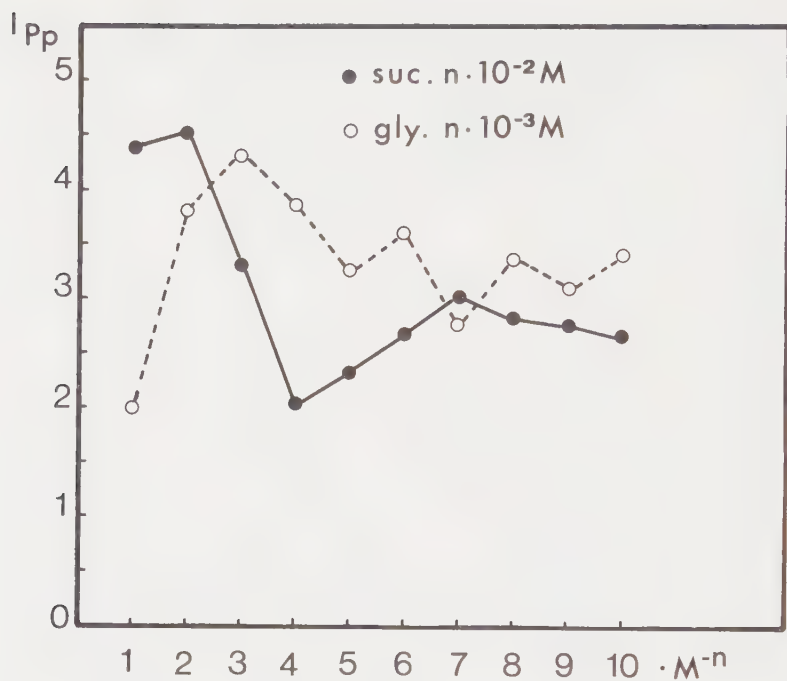


Fig. 4

Production pigmentaire en fonction de la concentration en glycine et en succinate

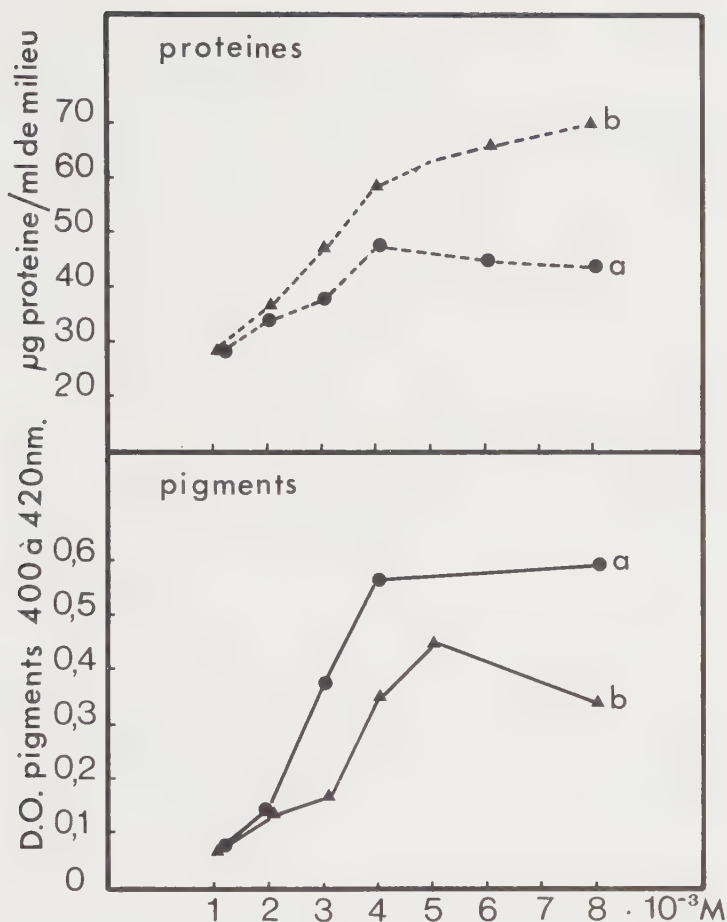


Fig. 5

Accumulation de pigment et de protéines en présence

a) de succinate $n.10^{-3}M$

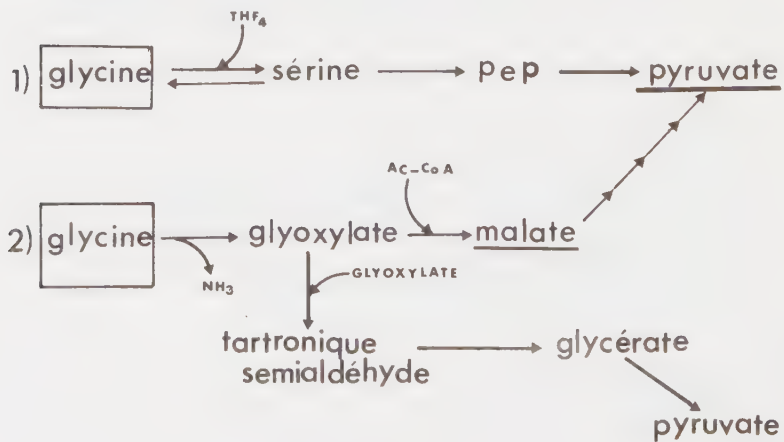
b) de succinate $n.10^{-3}M$ + glyoxylate $n.10^{-3}M$.

3. Discussion

La glycine est une molécule biochimiquement très active. Elle participe à la biosynthèse d'une quantité considérable de matériel cellulaire. Gouda (1966) a montré que *Ps. fluorescens* cultivé sur un milieu contenant de la glycine possède l'équipement enzymatique permettant la désamination en glyoxylate. Il attribue l'effet hypochrome de la glycine à son produit de désamination. D'autre part, dans un travail précédent publié par Gouda et Chodat (1963) sur la détection des acides cétoniques, produits du métabolisme de la glycine et de la glycyglycine, nous remarquons une quantité importante d'acide pyruvique, face à la quantité de glyoxylate :

Acides cétoniques	Glycine 0.5 %	Glycyglycine 0.5 %
Acide pyruvique	3.6 µg/ml	8.0 µg/ml
Glyoxylate	0.6 "	traces

Ce résultat est intéressant, car il suggère la formation d'acide pyruvique à partir de la glycine. Les voies de la Sérine ou du Glycérate sont les deux voies métaboliques connues pour la formation de l'acide pyruvique à partir de la glycine.



Chez *Ps. fluorescens*, le glyoxylate formé peut se combiner avec l'acétyl CoA pour produire le malate sous l'action de la malate-synthétase, enzyme du cycle du glyoxylate (Kornberg, 1958). Dagley, Trudgill et Callely (1961), ont isolé chez *Ps. acidovorans* les enzymes glyoxylate carboligase et tartro-nique semialdehyde réductase responsables de la voie du glycérate.

Les travaux de Hall et Crosbie (1971) ont montré que chez *Ps. reptilivora* la glycine est métabolisée en sérine, puis en pyruvate, et que les bactéries développées en présence de glycine et de succinate manifestent une faible activité en malate synthétase.

Le glyoxylate étant un inhibiteur de la chromogénèse, on est donc en droit de penser (au vu des résultats) que la glycine ne sera pas désaminée pour entrer dans la voie de la biosynthèse du pigment. La production de l'ammoniaque dans les cultures de *Ps. fluorescens* contenant la glycine, ne provient pas forcément d'une désamination primaire de la glycine. Ces bactéries sont connues pour leur caractère ammonigène et l'ammonium est un sous-produit du catabolisme des composés azotés.

Nous pouvons conclure que la glycine entre, soit directement dans la biosynthèse du pigment, soit indirectement par la voie de la sérine. L'effet inhibiteur du glyoxylate doit être lié à l'intégrité de cette molécule (Gouda, 1966). L'exemple de l'action inhibitrice de cette dernière sur la glutamate synthétase est bien connue (Cohen, 1967). Cet enzyme allostérique est sous régulation multivalente et possède huit modulateurs négatifs de contrôle par rétroinhibition (Lehninger, 1970). Ainsi le glyoxylate, par son action inhibitrice, empêcherait la formation de glutamine, qui est le distributeur du groupe azoté dans la biosynthèse de divers noyaux aromatiques ainsi que dans la formation d'acides aminés. L'azote étant un des éléments du pigment vert fluorescent (Turfitt, 1937; Turfreijs, 1938; et Chakrabarty, 1964), nous pouvons penser à un mécanisme qui empêcherait la formation de pigment par manque d'azote ! (séquestration).

CHAPITRE III

SEPARATION DU COMPLEXE PIGMENTAIRE1. Chronologie de l'isolement du complexe

L'extraction, la séparation, la purification et l'étude des propriétés physico-chimiques de la pyoverdine ont fait l'objet de nombreuses recherches depuis fort longtemps (1936).

Les méthodes de séparation proposées dans les publications sont souvent très différentes; d'autre part, les bactéries productrices du pigment sont également très variées.

Nous résumons brièvement (cf. Tableau 4, pages 30 à 32) les divers résultats obtenus par les différents auteurs. Les travaux effectués sur d'autres bactéries (*Ps. aeruginosa*, *Ps. mildenbergii*, *Azotobacter*, etc..) permettent une comparaison des propriétés du pigment, ainsi qu'une approche de la connaissance de sa structure chimique.

Tableau 4 - Chronologie de la séparation du pigment

Auteurs	Germe	Méthode de séparation	Nombre de fractions	Absorption ($\lambda_{\text{max.}}$, nm) couleur	Observation
Turfitt (1936)	Ps. fl.	Adsorption, électrodialyse élution par ac. acétique	1	$ \begin{array}{c} \text{OH}^- \\ \xrightarrow{\quad} 410 \\ 370 \xleftarrow{\quad} \text{H}^+ \end{array} $	réaction de Millon $\oplus$
Giral (1936)	Ps. fl.	Adsorption, élution par eau, acétone et pyridine	Comp. I 2: Comp. II	----- 250, 375, 380	ne vire pas avec H^+ ou OH^- indicateur de pH
Turfreijer (1941)	Ps. fl.	cf. sous Giral	1	fl. verte	poudre brune de formule $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{O}_8\text{N}_7$
Birkhofer (1948)	Ps. fl.	Adsorption sur alumine	Comp. I 2: Comp. II	----- jaune à fl. jaune	Pigment de nature flavinique -----
Chodat (1951)	Ps. fl.	Chromatographie sur papier	zone I 2: zone II	fl. jaune fl. bleu-vert	-----
Naves (1955)	Ps. fl.	Adsorption, élution par ac. acétique et pyridine	Comp. I 2: Comp. II	267 - 270 389 - 410	Pigment de nature ptérinique Pigment de nature ptérinique flavinique

Tableau 4 - Chronologie de la séparation du pigment (suite)

Auteurs	Germes	Méthode de séparation	Nombre de fractions	Absorption ($\lambda_{max.} = nm$) couleur	Observation
Johnstone (1959)	Azotobacter	Adsorption sur charbon actif	2: F.I F.II	370 $\xrightleftharpoons[OH^-]{H^+}$ 420	
Bulen et Le Comte (1962)	Azotobacter	Résine Dowex	+++	-----	62 % ac. aminés
Osawa et al. (1963)	Ps. aer.	Sephadex G-25 élution par eau	2: F.I F.II	400, 260, 230 -----	indicateur de pH
Love et Hulcher (1964)	Cellvibrio gilvus	Cellex - P (H^+) élution par tampon phosphate	+++ F.I	400	-----
Neuzil et al. (1966)	Ps. aer.	Sephadex G-25 élution par hydroxyde d'ammonium	4: F.I	406-410, 260-275, 230	-----
Gouda (1966)	Ps. fl.	Electrophorèse en présence de $CO_3(NH_4)_2$	V_1-V_2 5: B_1-B_2 B_0	415-420, 275, 232, 210 402-405, 266, 225, 233 400, 255	pyrrole + pyrrole + pyrrole +

Tableau 4 - Chronologie de la séparation du pigment (suite)

Auteurs	Germes	Méthode de séparation	Nombre de fractions	Absorption ($\lambda_{max.}$ =nm) Couleur	Observation
Hulcher (1968)	Ps. mild.	Sephadex G-25 élution par eau	+++ : F.I	402, 262, 232, 203	43 % ac. aminés
Newkirk et Hulcher (1969)	Ps. mild.	Sephadex G-25 élution par eau	+++ : Comp. I	402, 278	26 % ac. aminés
Viscontini (1969)	Ps. Ros. fl.	Cellulose élution par hydroxyde d'ammonium	1 2 +++ : F.I 3 4	fl. bleu-vert	I ₁ Proferrosamine (ac.am.) I ₂ Monaptérine I ₃ Riboflavine I ₄ Porphyrine
Favre (1969)	Ps. fl.	Sephadex G-25 élution par hydroxyde d'ammonium	5 : S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₅	400-420, 266-275 230-233	-----
Winters et Corpe (1971)	Ps. fl.	Sephadex G-100 élution par tampon phosphate	+++ : Pic I	-----	Protéine pigmentée

+++ = nombreuses
fractions

2. Séparation par filtration sur Gel Sephadex G-15

L'étude du mécanisme de la production du complexe pigmentaire, la détermination de sa structure chimique et la régulation de son métabolisme, exige l'analyse précise des pigments présents dans le milieu.

Les techniques chromatographiques et électrophorétiques ne permettent pas la séparation d'une grande quantité de pigment natif. Nous avons adopté la technique de filtration sur gel Sephadex, utilisée pour la première fois par Osawa (1963) et Neuzil (1966), sur *Ps. aeruginosa*, puis par Favre (1969) sur *Ps. fluorescens*.

2.1. Effet de différents éluants sur la séparation du complexe pigmentaire

La diversité des méthodes préconisées par les auteurs a rendu difficile la comparaison rationnelle des différentes fractions obtenues lors de la séparation du complexe pigmentaire. L'examen de ces méthodes montre que le pH, la force ionique et la nature de l'éluant jouent un rôle important dans l'isolement des différentes fractions, ainsi que dans le nombre de composés obtenus. Ceci nous a conduits à examiner l'effet de divers éluants sur la séparation par filtration sur gel Sephadex.

Nous avons essayé de maintenir toutes les conditions identiques, concernant le milieu nutritif, l'âge de culture, le volume d'échantillon et le débit d'élution.

Au cours de cette expérience nous avons utilisé les éluants suivants :

- . H₂O bidistillée (pH 5.6)
- . Solution de NaCl 0.1 M (pH 6.0)
- . Solution-tampon phosphate K₂HPO₄ + NaH₂PO₄ 0.1 M (pH 7.0)
- . Solution de carbonate d'ammonium 0.08 M (pH 8.7)
- . Solution d'hydroxyde d'ammonium 0.02 M (pH 9.0)
- . Solution-tampon "tris" 0.1 M (pH 10.0)

2.2. Résultats

Lors de l'utilisation d'éluateurs à pH 5.6 à 6.0, nous constatons une forte adsorption de composés à fluorescence bleue sur la colonne.

Au fur et à mesure que le pH augmente, le volume d'élution des fractions principales décroît et nous n'observons plus d'adsorption ou de retard dans l'élution.

La Fig. 6 représente les différents chromatogrammes obtenus au cours de cette expérience.

Le tableau 5 indique les caractéristiques des fractions obtenues. Le spectre du pic principal est toujours situé vers 400 nm et présente une forte densité optique, sauf dans le cas du tampon phosphate, où les spectres montrent nettement l'hétérogénéité des fractions (cf. Fig. 7 et 8).

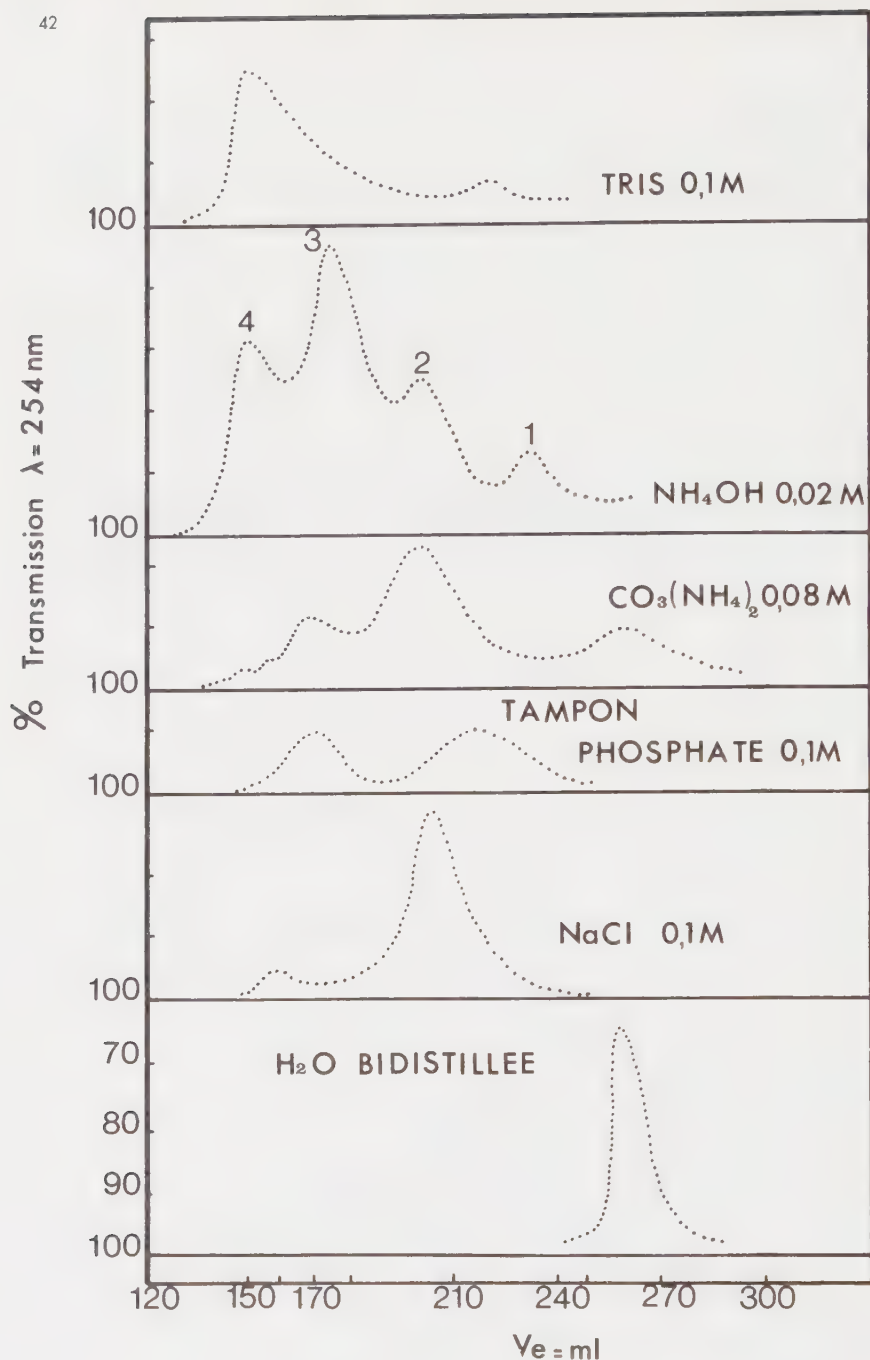


Fig. 6

Action de différents éluants sur la séparation du complexe pigmentaire

$V_0 = 158 \text{ ml}$, $V_t = 430 \text{ ml}$

Tableau 5 - Résumé des résultats de la séparation sur Sephadex G-15

Eluant	Ve (ml)	Couleur	Fluorescence	Spectre d'absorption $\lambda_{\text{max.}} = \text{nm}$
Eau	adsorbé 270	vert pâle jaune-vert	bleue bleu-vert	400, 263, 228 400, 263, 231
NaCl	adsorption 216 171	jaune-vert incolore	bleu-vert bleu pâle	402, 265, 234, 205 (400), 260, 225, 203
Tampon phosphate	adsorption 234 187	incolore verdâtre	bleue bleue	390, 225 398, 380, 260, 230
$\text{CO}_3 (\text{NH}_4)_2$	282 216 183 168 159	incolore jaune-vert pâle vert pâle beige clair incolore-beige	bleu pâle bleu-vert bleu-vert bleu pâle nulle	267, 205 402, 265, 235 400, 265, 230 400, 275, 210 non mesurable
NH_4OH	258 252 219 186 159	incolore incolore verdâtre jaune-vert beige-marron	bleu pâle bleue bleu-vert verte bleu-vert	(402), 268 (400), 270, 233 410, 273, 233 420, 275, 235 405, 270, 225
Tampon "tris"	228 159	incolore jaune-beige	bleue bleu-vert	(402), 266, 215 408, 266, 235, 215

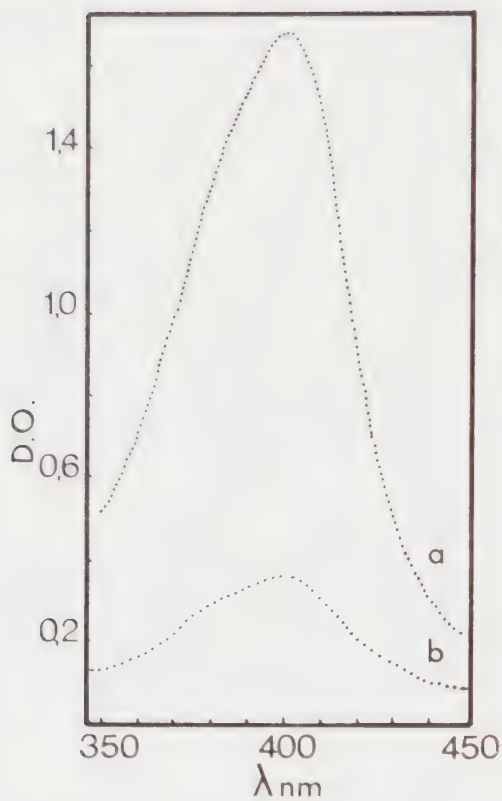


Fig. 7

Spectre d'absorption des fractions éluées par l'eau bidistillée

a) fraction éluee à $V_e = 270$ ml

b) fraction adsorbée, puis éluee par le $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$.

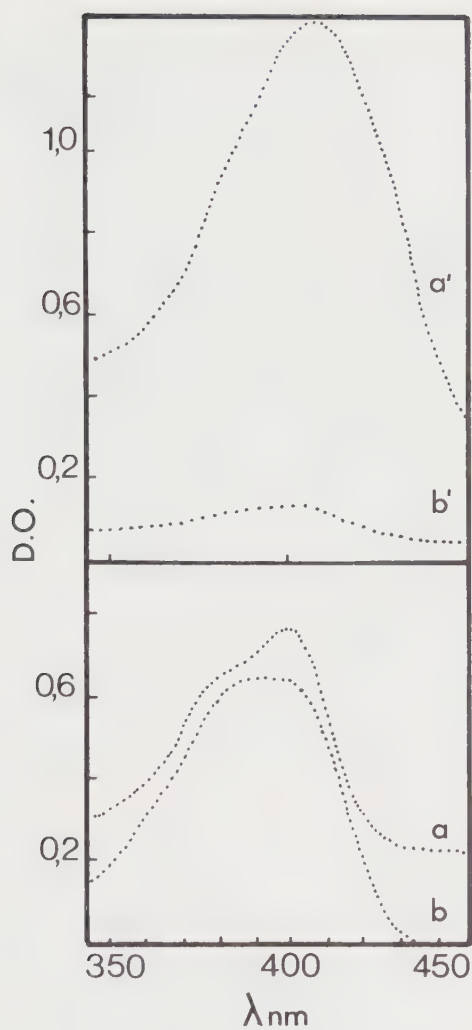


Fig. 8

Spectre d'absorption des fractions éluées par le tampon phosphate (a et b) et le tampon tris $10^{-1}M$ (a' et b').

a et a') fractions éluées à $V_e = 187$ et 139 ml

b et b') fractions éluées à $V_e = 234$ et 228 ml.

3. Discussion

L'analyse de nos résultats représentés sur le tableau 5 (page 36) nous renseigne sur les relations existant entre le nombre de fractions éluées, le pH, la force ionique et la nature chimique de l'éluant.

3.1. Lors de l'emploi d'éluants à pH acide ou neutre, nous obtenons deux fractions. L'élution par l'eau bidistillée favorise l'adsorption d'une substance à fluorescence bleue sur le gel Sephadex. Sommer (1966) remarque une rétention prononcée des composés lors de l'emploi d'eau pure. L'adsorption ou l'élution retardée peuvent être attribuées, selon Gelotte (1960), à la présence de noyaux aromatiques ou hétérocycliques de faible poids moléculaire. Determann (1968) signale le retard très important causé par l'interaction des composés à groupement hydroxyle avec le gel Sephadex.

Il nous semble évident que l'eau bidistillée n'est pas un éluant adéquat pour la séparation du complexe pigmentaire.

La relation existant entre le nombre de fractions éluées et le pH acide nous donne une meilleure compréhension des résultats obtenus par Giral, 1936: Naves, 1955: Birkhofer, 1948: et Osawa, 1963: ces auteurs n'ayant obtenu que deux composants (cf. Tableau 4, pages 30 et 31).

3.2. L'emploi d'éluants de pH 8,7 et 9,0 est favorable à une séparation plus poussée du complexe pigmentaire. L'hydroxyde d'ammonium favorise une meilleure séparation des fractions. Avec cet éluant, nous obtenons une fraction jaune-vert à fluorescence verte, absorbant 420 nm, qui est l'image fidèle de la couleur des milieux de culture et correspond à l'absorption du surnageant à cette longueur d'onde. Nous avons choisi d'utiliser pour nos expériences ultérieures la solution d'hydroxyde d'ammonium $10^{-2}M$.

3.3. L'élution avec le tampon "tris" à pH 10.0 semble dénaturer le pigment. La couleur jaune-verte disparaît et la fraction principale absorbe à 408 nm. L'élution très rapide d'une fraction principale par le tampon

"tris" peut être attribuée à la formation d'un lien entre les ions multivalents du "tris" et le pigment. Nos essais avec une solution d'hydroxyde d'ammonium (pH 10.0) ne donnent pas le même résultat.

La nature de l'éluant joue ainsi un rôle important dans la séparation du pigment. Nos résultats nous permettent de comparer les fractions obtenues par les différents auteurs : la composante I de Giral (1936) ainsi que la fluorescence I d'Osawa (1963) et la fraction I de Neuzil (1966) présentent les caractéristiques de notre fraction 4, jaune-beige à faible fluorescence bleu-vert. La pyoverdine de Hulcher (1968) présente le spectre typique de notre fraction 3, jaune-vert à fluorescence vert-bleu. Il s'agit peut être de pigments de nature chimique identique. Nos observations sur le comportement du complexe pigmentaire de *Ps. fluorescens* envers les différents éluants sont favorables à l'hypothèse de l'existence de groupes acides et basiques sur la molécule pigmentée. Porath (1960) observe un tel comportement lorsqu'il s'agit d'acides aminés, de dérivés d'acides aminés ou de peptides de faible poids moléculaire.

La nature peptidique du pigment vert fluorescent, signalée par plusieurs auteurs (Bulen et Le Comte, 1962; Love et Hulcher, 1964; Newkirk et Hulcher, 1969; Winters et Corpe, 1971) est en faveur de nos résultats. Nos recherches ultérieures sur la nature du pigment et de sa biosynthèse confirmeront cette hypothèse.

4. Traitement du surnageant des cultures chromogènes

La crainte d'une dégradation ou d'une dénaturation du complexe pigmentaire lors de l'évaporation à sec, sous pression réduite à 60°C, nous a conduits à vérifier par chromatographie le complexe pigmentaire dans trois conditions :

4.1. Surnageant non traité

4.2. Surnageant évaporé à sec, puis purifié par la méthode II de Gouda (1966)

4.3. Surnageant évaporé à sec, puis repris par l'eau distillée.

Résultats :

La Fig. 9 (page 42) met en évidence la présence de trois pics principaux avec le même volume d'élution. La purification par la méthode de Gouda ne change pas l'allure du chromatogramme et n'améliore pas vraiment la séparation des fractions.

La concentration en pigment du surnageant non traité est évidemment plus faible, d'où la hauteur des pics diminuée. La fraction 1 n'apparaît pas. Nous avons utilisé 10 ml de surnageant et 40 ml de milieu centrifugé, puis évaporé à sec.

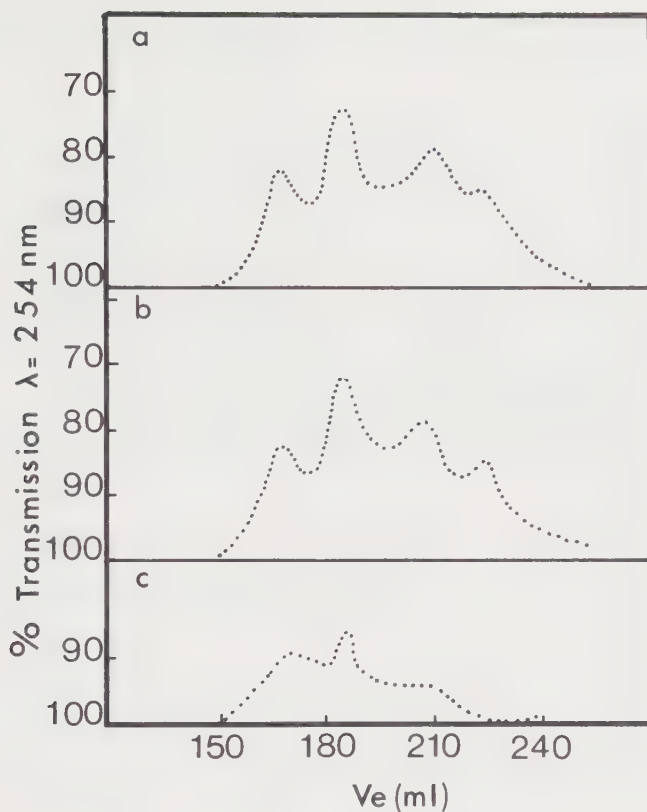


Fig. 9

Séparation du complexe pigmentaire

a) surnageant évaporé à sec

b) surnageant purifié, puis évaporé à sec

c) surnageant non traité

Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2} \text{ M.}$

5. Caractéristiques des diverses fractions issues des milieux chromogène et achrome

Dans le premier chapitre nous avons décrit l'effet de la concentration du substrat nutritif sur la chromogénèse. Dans un milieu riche en lactate d'ammonium (15 g/l) les bactéries sont cytochromiques, le milieu reste incolore durant toute la phase logarithmique. En lumière ultraviolette nous observons une fluorescence bleue.

Nous avons chromatographié à la fin de la phase logarithmique d'une part le surnageant d'un milieu achrome, d'autre part, celui d'un milieu chromogène (Fig.10, page 44).

Les caractéristiques et le spectre des fractions des deux chromatogrammes sont présentés dans les tableaux 6 et 7 , pages 45-46 et les Fig. 11 et 12 (pages 47-48).

En cultures achromes, les fractions 2 et 3 sont absentes. La fraction 4 n'absorbe pas dans le visible. Une fraction importante, appelée F_X , est élue tardivement ($V_e = 510$ ml).

La fraction 3 des milieux chromogènes a été purifiée par plusieurs passages sur colonne: son spectre de fluorescence est reproduit sur la Fig. 13, page 49. La fraction 2 purifiée présente exactement le même spectre, mais avec un déplacement de 20 nm vers les ondes courtes.

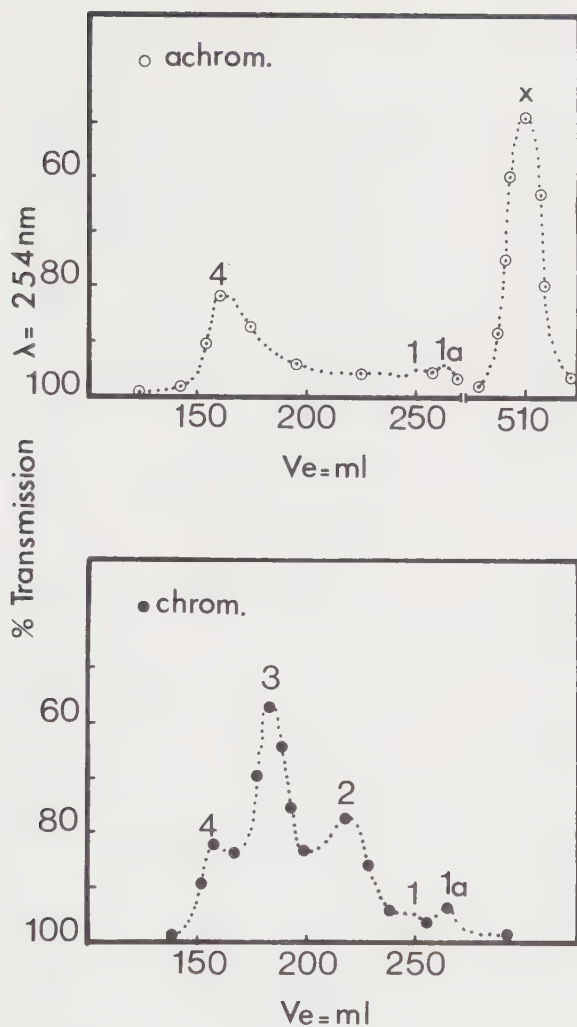


Fig. 10

Séparation des fractions issues des systèmes chromogène et achrome
(fin de la phase logarithmique de la croissance)

Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M.}$

Tableau 6 - Milieu chromogène - Caractéristiques spectroscopiques des fractions du complexe pigmentaire obtenues après chromatographie sur Sephadex G-15. Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$.

Fractions	V_e (ml)	Kd	Spectre d'absorption $\lambda_{\text{max.}} = \text{nm}$	Spectre d'émission $\lambda_{\text{max.}} = \text{nm}$ *	Couleur	Fluorescence
1	240	0.40	400 270 233	470	incolore	bleu pâle
2	219	0.26	410 273 233	475	vert pâle	bleu-vert
3	186	0.11	420 275 235	485	vert-jaune	verte
4	159	< 0	405 270 225	480	beige-marron	bleu-vert
1 _a	258	0.44	(402) 268 -	-	-	bleue

* λ d'excitation à 405 nm

Tableau 7 - Milieu achrome - Caractéristiques spectroscopiques des fractions obtenues après chromatographie sur Sephadex G-15. Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$.

Fractions	V_e (ml)	Kd	Spectre d'absorption $\lambda \text{ max.} = \text{nm}$	Spectre d'émission $\lambda \text{ max.} = \text{nm} *$	Couleur	Fluorescence
X	510	1.59	-	485	jaune-verdâtre	vert-bleu
1	250	0,4	402, 268, 225,	470	incolore	bleue
1 _a	260	0.44	- 268, -	-	incolore	bleu pâle
4	157	<0	- 270 -	-	incolore	bleu pâle

* λ d'excitation est à 405 nm

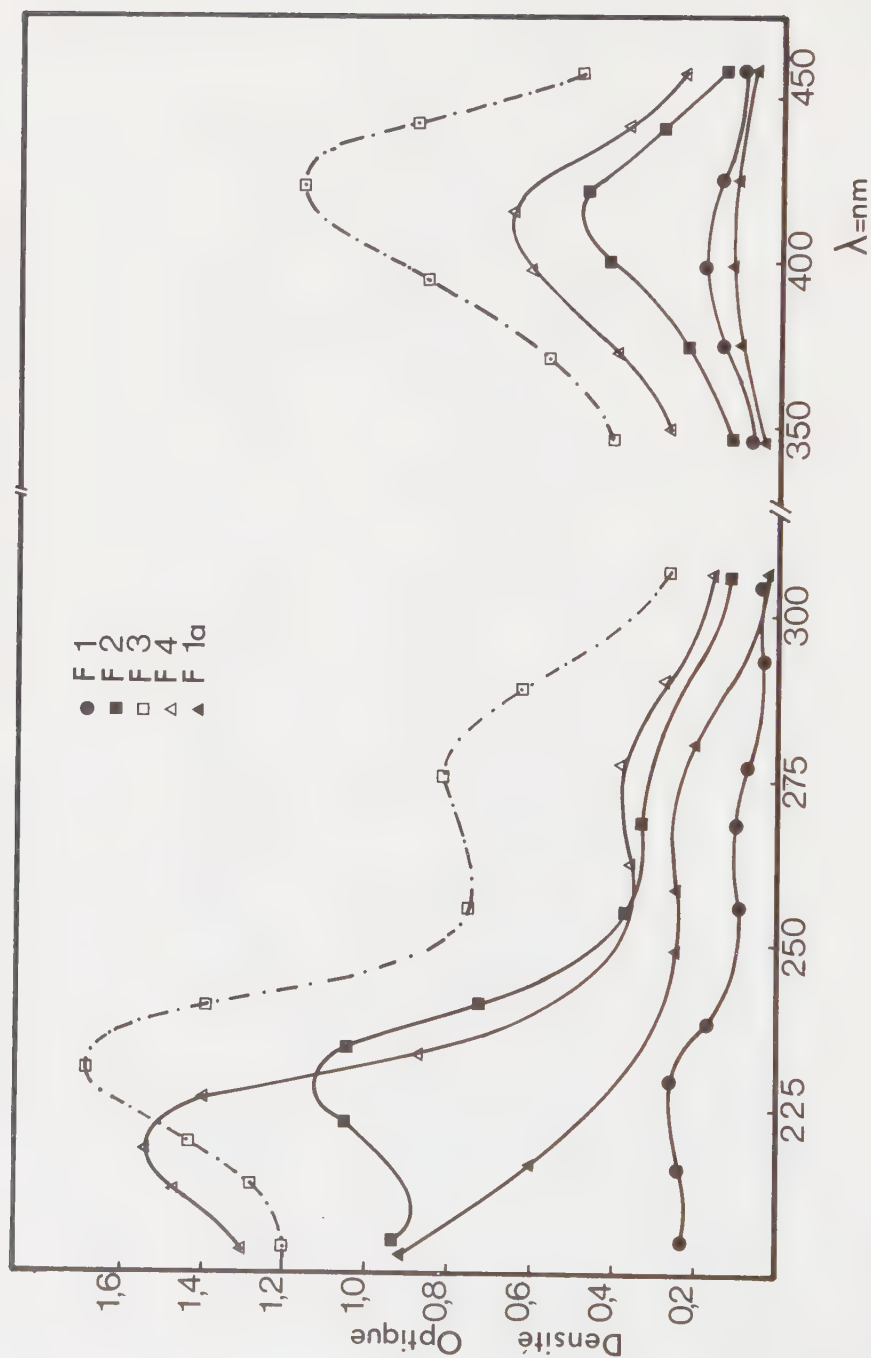


Fig. 11 - Spectre des cinq fractions du complexe pigmentaire éluées par $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$ (pH = 9) dans le système chromatogène.

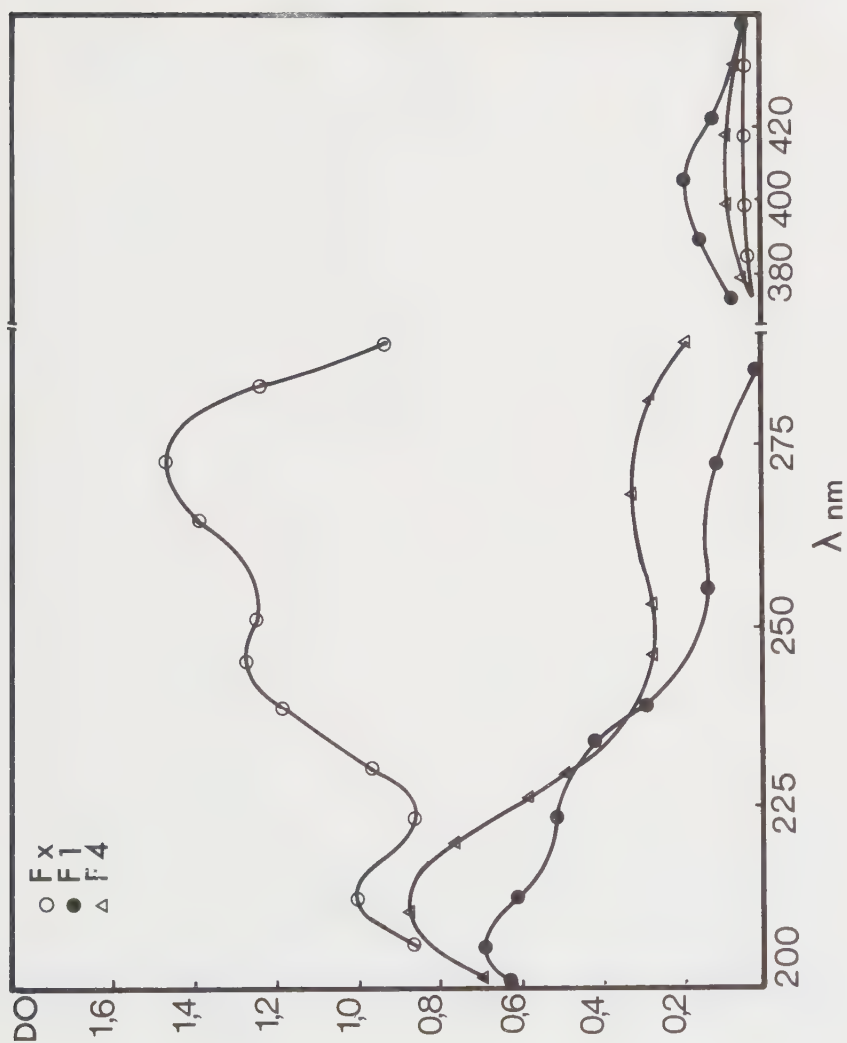


Fig. 12 - Spectre d'absorption des fractions éluées par $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$ (pH = 9) dans 1^e système achrome.

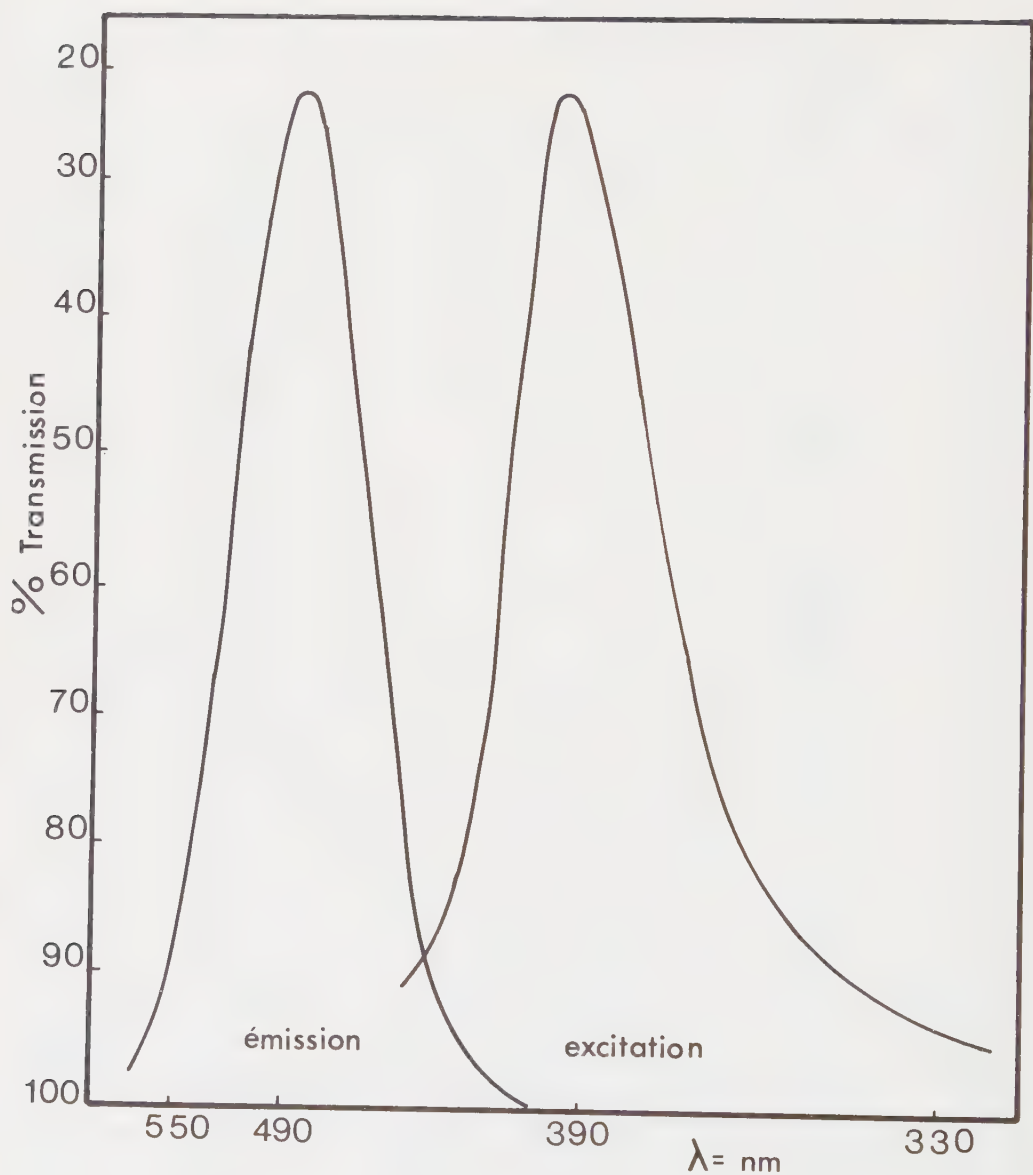


Fig. 13

Spectre d'excitation et d'émission de la fraction jaune-vert à fluorescence verte (F_3), éluée par $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$ (pH 9).

CHAPITRE IV

QUELQUES DIFFERENCES PHYSIOLOGIQUES ENTRE LES SYSTEMES CHROMOGENE ET ACHROME

1. Métabolisme oxydatif

Ps. fluorescens possède un pouvoir oxydatif très grand et plutôt unique dans le monde microbien. Il a la faculté de s'adapter d'une manière extraordinaire à l'offre du milieu ambiant. Ses facultés d'adaptation sont en rapport direct avec la flexibilité des voies respiratoires. La réponse adaptative de cette bactérie à l'égard de l'oxygène, mise en évidence par Lenhoff et Kaplan (1956) a certainement une signification dans le changement des voies métaboliques. Sous forte tension d'oxygène, la bactérie diminue son contenu en cytochromes et augmente ou met en jeu la synthèse de diaphorases, de pigments flaviniques ainsi que de la pyoverdine.

Le désir de connaître la différence physiologique existant entre les bactéries achromes et chromogènes nous a guidés pour les expériences suivantes.

Nous allons étudier le métabolisme oxydatif en cultures continues ou cultures à système ouvert, et en cultures normales en flacons, ou système fermé (Pirt, 1972).

1.1. Culture continue :

Dans un tel système, le taux spécifique de croissance et de multiplication varie en fonction du taux de dilution (débit) du milieu nutritif. A un débit constant correspond un taux de multiplication constant (Monod, 1942). Lorsqu'un état d'équilibre est atteint, les conditions constantes peuvent être maintenues indéfiniment (chimiostat).

D'autre part, en culture continue, par le changement du débit, on peut en quelque sorte se déplacer dans le temps et observer des modifications physiologiques caractéristiques, similaires à celles

observées aux différentes phases de la croissance en culture normale (El-Sabeh, 1967).

Nous avons commencé par un débit élevé (115 ml/heure) puis nous avons diminué graduellement ce débit jusqu'à 14 ml/heure. Nous avons ensuite mesuré la respiration bactérienne après une adaptation à chaque débit. Les substrats utilisés sont les suivants : succinate, asparagine, glycine et glyoxylate.

Lorsque les mesures à l'appareil de Warburg sont terminées (après 120 minutes), les suspensions sont centrifugées, les surnageants sont destinés à un examen au fluorimètre, afin de détecter le pigment incolore à fluorescence bleue. En effet, cette substance apparaît en premier lors de la croissance bactérienne.

Résultats

Nous allons examiner les résultats dans l'ordre suivant :

- 1.1.1. synthèse des protéines et du complexe pigmentaire en fonction du débit
- 1.1.2. oxydation des substrats chromogènes et anti-chromogènes en relation avec la pigmentogenèse
- 1.1.3. production de pigment incolore à fluorescence bleue, en fonction de l'activité respiratoire.

1.1.1. synthèse des protéines et du complexe pigmentaire :

Un débit élevé (115 ml/heure) correspond à une concentration élevée en substrat nutritif et le rapport oxygène/substrat est faible. Les cultures sont achromes et il y a absence totale de pigment jaune-vert. Dans ces conditions, où la vitesse de renouvellement des produits est grande, le taux absolu en protéines est faible, mais la vitesse de multiplication et la productivité des bactéries sont fortes.

Lorsque le débit diminue, les bactéries ont le temps d'appauvrir leur milieu, elles adoptent alors un régime plus économique. le problème de survie devient important et les germes se multiplient plus lentement.

Dans ces conditions, la quantité absolue de protéines dans le milieu augmente (mais la productivité baisse) et la production de pigment jaune-vert atteint un maximum de concentration.

La Fig. 14 ci-dessous présente la variation des protéines et de la pyoverdine en fonction du débit.

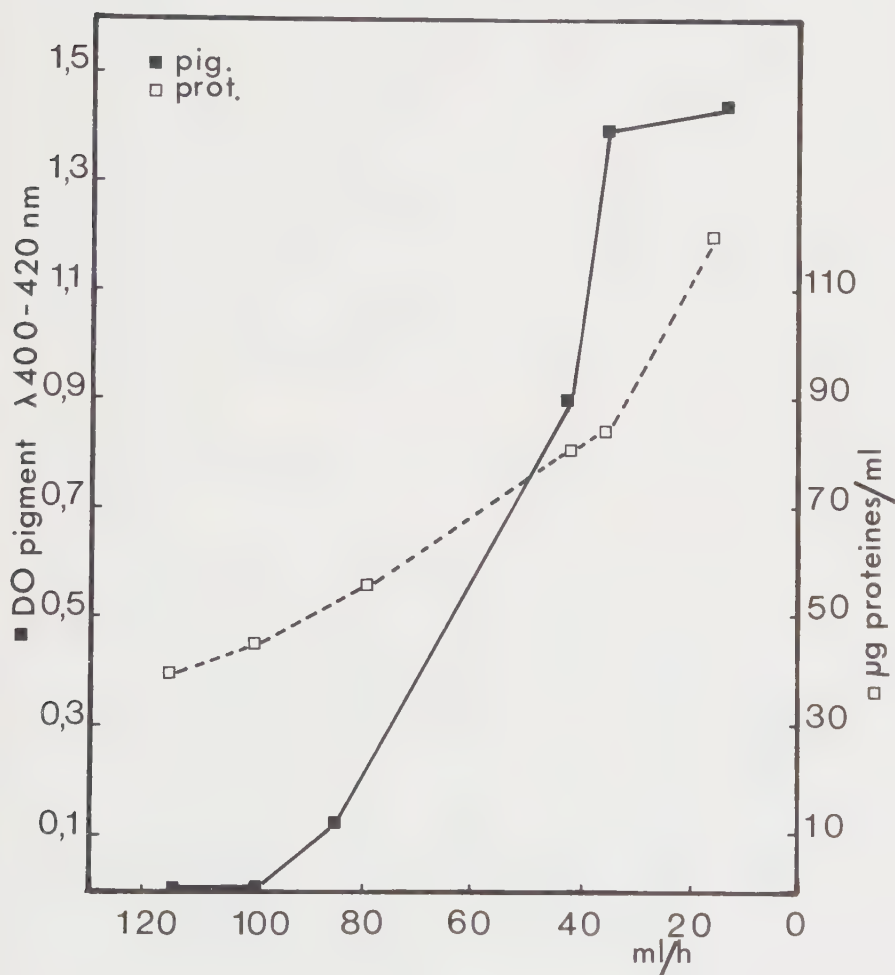


Fig. 14

Variations de taux en protéines et en pyoverdine selon le débit nutritif (culture continue) —■—■—■ Pigment, □--□--□ Protéines

1.1.2. oxydation de substrats chromogènes et antichromogènes

La Fig. 15, page 54, et le tableau 8 ci-dessous nous renseignent sur le comportement de ces substrats. On y observe quatre phases distinctes :

- . dans la première phase, nous observons une augmentation de la consommation d'oxygène en présence de glycine et de glyoxylate et une diminution en présence d'asparagine et de succinate (forte multiplication en bactéries),
- . dans la deuxième phase le phénomène est inversé,
- . dans la troisième phase il y a une stabilisation de la consommation en glycine et en glyoxylate. Nous remarquons d'autre part une forte consommation d'O₂ en présence de succinate et d'asparagine (associée à la production en pigment),
- . dans la quatrième phase il y a une diminution très nette de l'activité respiratoire en présence des quatre substrats.

Tableau 8 - Différentes phases observées en culture continue

Phases	Débit ml/heure	D.O. Pigment
I	115 - 100	0
II	100 - 86	0 - 0.100
III	86 - 43	0.410 - 0.905
IV	43 - 14	0.905 - 1.400

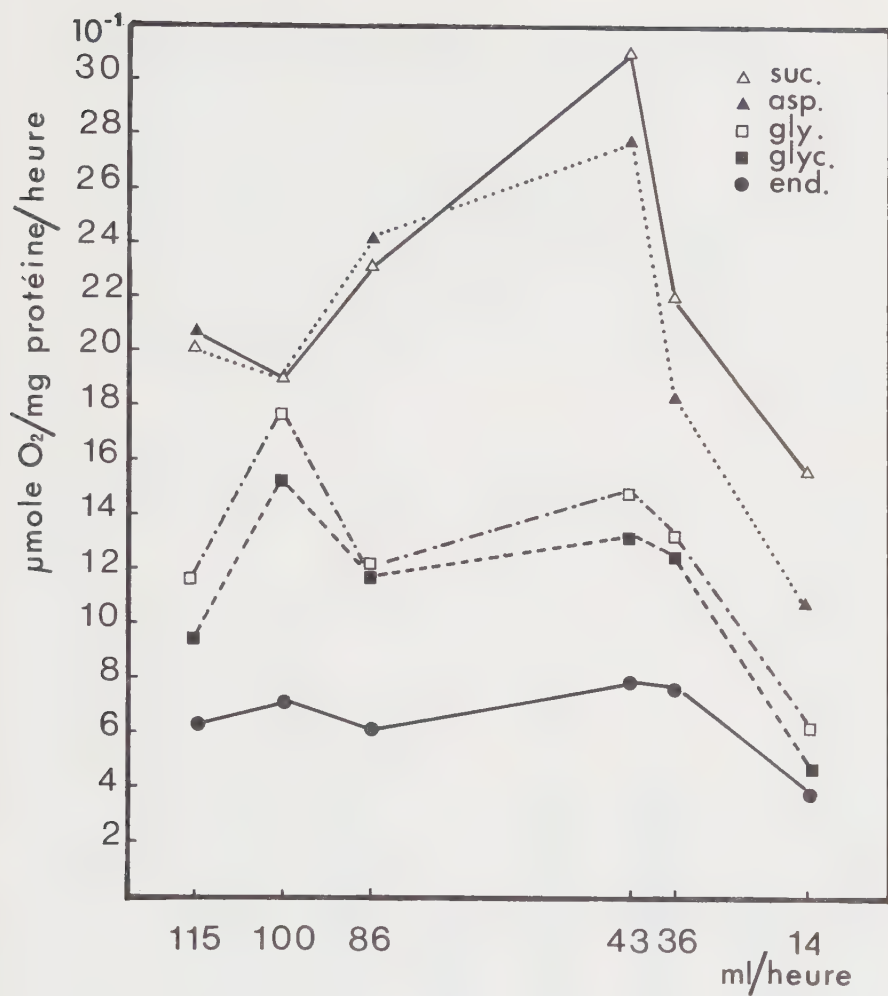


Fig. 15

Oxydation de divers substrats selon le débit nutritif
(culture continue).

1.1.3. production de pigment en fonction de l'activité respiratoire

Nous avons étudié entre autres l'effet combiné glyoxylate-succinate et glycine-succinate sur l'activité respiratoire et la production de pigment (mesure de la fluorescence bleue). La Fig. 16 ci-dessous montre l'effet inhibiteur de la molécule de glyoxylate, même en présence de succinate. Il semble qu'en présence du glyoxylate un arrêt ou une déviation de la biosynthèse en pyoverdine soient réalisés.

L'effet hypochrome de la glycine mentionné par Gouda (1966) ne se manifeste pas. Cette action était en fait due à la forte concentration utilisée par l'auteur.

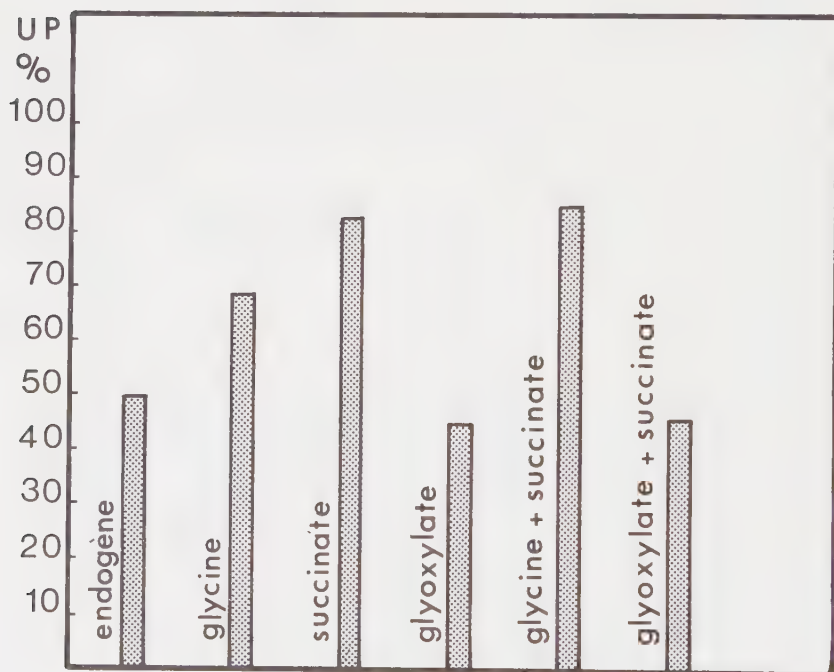


Fig. 16

Mesure de la fluorescence liée à la production en pigment après l'oxydation de divers substrats par une suspension bactérienne.

UP = unité Photovolt.

1.2. Culture en système fermé

Dans ce système la formation des états transitoires est possible. Les conditions nutritives changent continuellement et on aboutit à un état statique final.

Nous avons étudié la consommation d'oxygène en présence des quatre substrats déjà utilisés en culture continue. Nous avons mesuré l'activité respiratoire des deux systèmes au cours de la croissance, du début jusqu'à la fin de la phase logarithmique.

1.2.1. Respiration endogène :

La consommation d'oxygène est plus importante pour les bactéries achromes. Au début de la phase logarithmique, les bactéries sont métaboliquement très actives et la consommation d'oxygène est élevée dans les deux systèmes. Cette consommation d'O₂ baisse régulièrement au cours de la croissance dans le système achrome, mais dans les cultures chromogènes, nous observons une activation de la respiration, correspondant à l'apparition de la pyoverdine. Lorsque la synthèse pigmentaire est terminée, la respiration endogène décroît pareillement au système achrome.

1.2.2. Oxydation des substrats

L'examen des Fig. 17 et 18 (pages 57-58), comparant les deux systèmes, nous permet de tirer les conclusions générales suivantes :

Les bactéries chromogènes possèdent un pouvoir d'oxydation plus faible que les bactéries achromes.

Dans le système achrome, le glyoxylate ne semble pas être favorable: comparé avec la respiration endogène, il y a même une inhibition. Le glyoxylate n'affecte pas le rythme respiratoire des bactéries chromogènes d'une façon significative. Un phénomène d'adaptation et d'induction semble intervenir pour métaboliser cette molécule. Quant à l'oxydation du succinate et de l'asparagine, nous observons le même phénomène, signalé pour les cultures continues. Au moment de la synthèse en pyoverdine, le pouvoir d'oxydation de ces deux substrats augmente chez

les bactéries chromogènes. Dans le système achrome il y a une diminution régulière du pouvoir oxydatif parallèle à une diminution d'activité métabolique. Un antagonisme existe dans la consommation d'oxygène en présence de substrats chromogène et anti-chromogène. Les cultures continues et les cultures en flacons nous fournissent le même résultat, cet antagonisme est le signe d'un changement de la voie respiratoire terminale (alternative respiratoire).

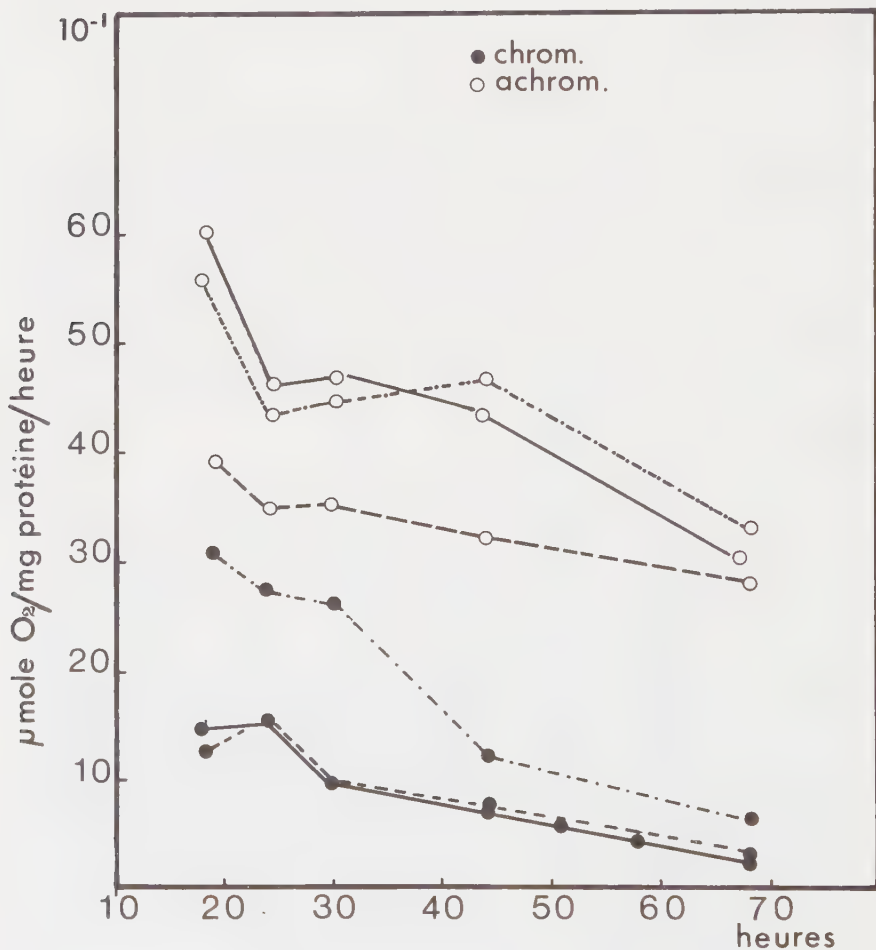


Fig. 17

Oxydation de la glycine et du glyoxylate dans les systèmes chromogène et achrome (culture en flacons)

— Endogène , - - - Glycine , - - - Glyoxylate

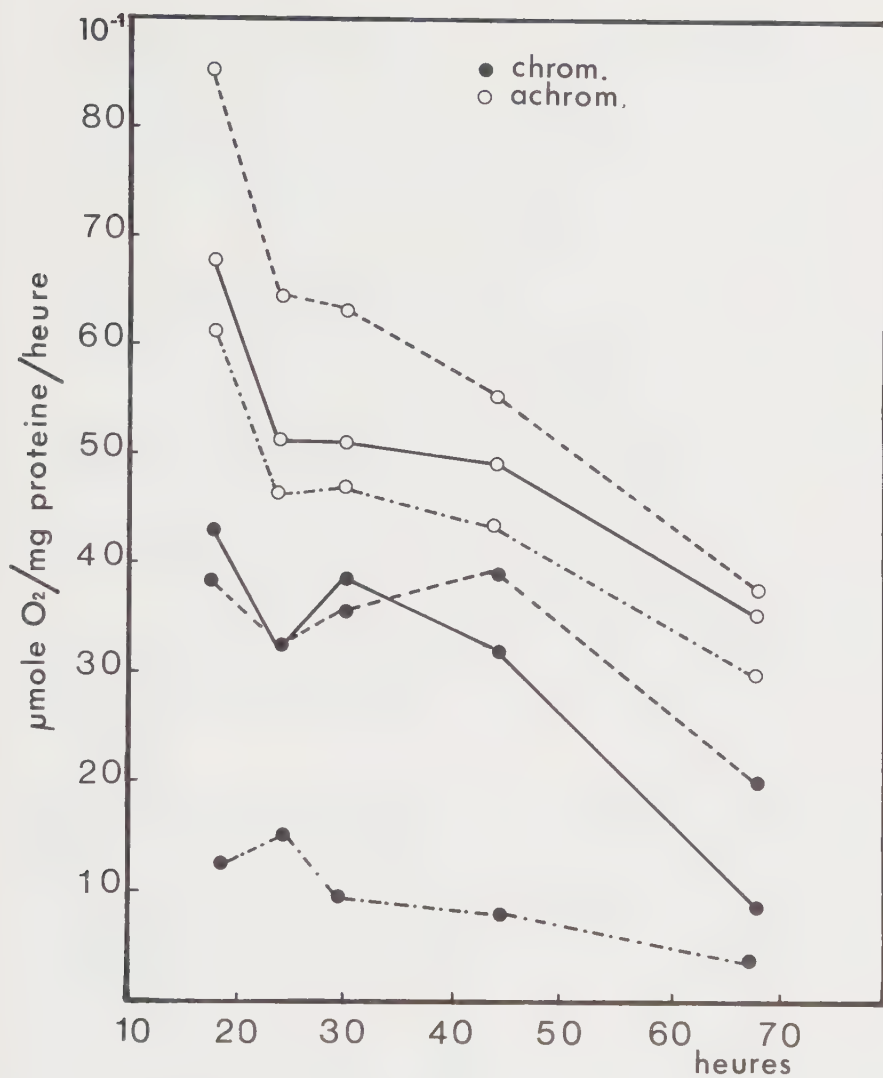


Fig. 18

Oxydation de l'asparagine et du succinate dans les systèmes chromogène et achrome

..... Endogène, ----- Asparagine, ——— Succinate

1.3. Discussion

Le passage d'un état achrome à un état chromogène se traduit par une augmentation du pouvoir d'oxydation de la bactérie pour les substrats succinate et asparagine (substances chromogènes). Dans les cultures en système fermé ce passage se manifeste tout au début de la phase logarithmique.

Ce passage d'un état à l'autre est le reflet des variations qualitatives de la chaîne respiratoire terminale. White et Smith (1962), White (1963) ont démontré chez *Haemophilus parainfluenza* qu'une variation quantitative de la chaîne respiratoire dépendait de l'aération et du moment de la phase de croissance considérée. Doi et Halvorson (1960), Dworkin et Niederpruem (1964) signalent une alternative respiratoire dans les cellules végétatives et les spores de *Bacillus cereus* et *Mycococcus xanthus*. Les cellules végétatives possèdent essentiellement une respiration cytochromique.

L'alternative respiratoire est un aspect de l'immense plasticité de la matière vivante. *Ps. fluorescens* en est un des exemples les plus démonstratifs (Lenhoff et Kaplan, 1956; Gouda, 1966; Greppin et Gouda, 1972).

L'augmentation du pouvoir d'oxydation de *Ps. fluorescens* en présence de substances chromogènes est une réponse cybernétique; elle est un signe du choix respiratoire (l'alternative respiratoire) nécessaire à l'ajustement aux nouveaux besoins liés à la présence en pigment (sans qu'il y ait nécessairement une liaison de cause à effet).

2. Taux en ATP et en cytochrome au cours de la croissance

Les phénomènes de multiplication et de croissance impliquent l'intégration de matière et d'énergie dans un système vivant, aux dépens du milieu extérieur. L'intégration de matière et d'énergie est réalisée au moyen des réactions chimiques que l'on peut grouper sous le nom de réactions anaboliques ou biosynthétiques. Ces réactions exigent de l'énergie. Celle-ci leur est fournie par les réactions cataboliques. La respiration est une réaction catabolique dans laquelle le substrat est oxydé par l'oxygène, accepteur terminal d'électrons. Le résultat de cette oxydation est la libération d'énergie emmagasinée dans le substrat et sa mise en réserve dans les molécules spécialisées telles que l'adénosine triphosphate (ATP). Ainsi la quantité d'ATP cellulaire donne un renseignement significatif sur le métabolisme énergétique de la cellule et sur sa capacité de biosynthèse.

Chez les bactéries le taux de croissance est un paramètre important dans l'étude des réactions métaboliques. La fin de la phase exponentielle d'une culture représente généralement la croissance totale. Dans un environnement de source d'énergie limitée, le point final de cette phase subit l'effet de ce facteur limite.

Expérience

Dans l'expérience qui suit nous avons deux systèmes différents quant à la concentration en source d'énergie. Nous allons examiner l'effet de cette différence sur la croissance, la production en protéine, le taux d'ATP et la concentration en cytochromes.

Résultats

2.1. Croissance :

L'étude des courbes de croissance (Fig.19a, page 62) déterminées par la turbidimétrie nous indique que :

- . la période de lag ou phase latente a une durée plus longue dans le système achrome. L'induction enzymatique en présence d'une forte concentration de la source nutritive est retardée.
- . la fin de la phase logarithmique et par conséquent le début des phé-

-nomènes de décroissance sont atteints plus rapidement dans le système chromogène.

- . La prolongation de la phase logarithmique des bactéries achromes n'est pas due uniquement à une multiplication, mais à une croissance de la taille bactérienne. L'examen au microscope électronique montre que les bactéries achromes deviennent très volumineuses à la fin de la phase logarithmique (Auderset, 1966).
- . Les travaux de Tissot (1972) ont montré que le cycle cellulaire est plus rapide dans le système achrome (1 h) que dans les systèmes chromogènes (1 h 30).
- . La production de protéine (Fig. 19b, page 62) indique une stimulation nette de ce métabolisme dans les milieux riches en substrats nutritifs.

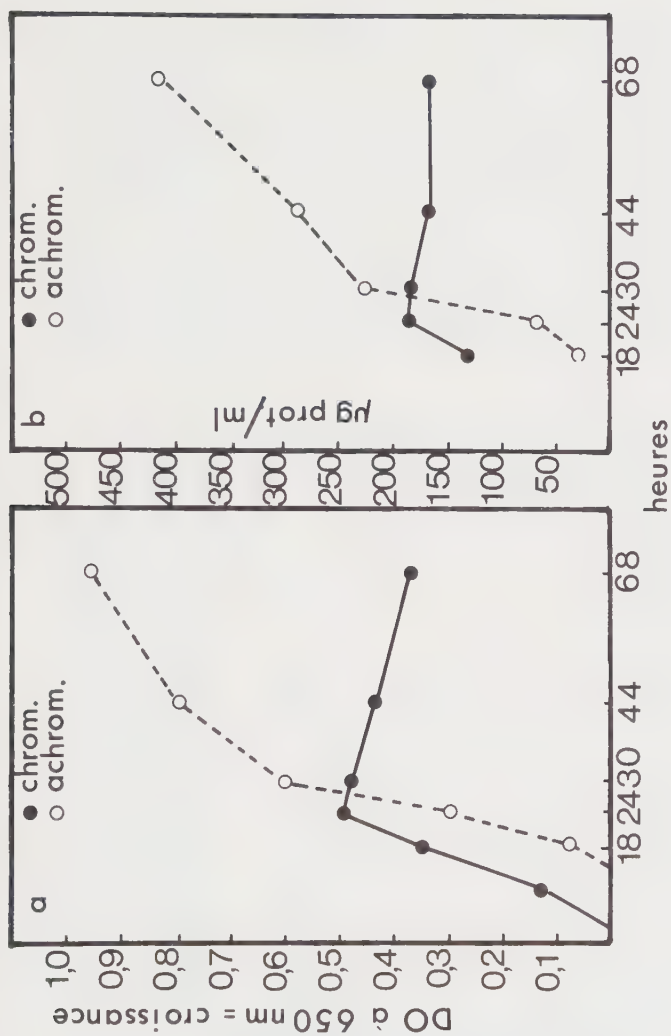


Fig. 19

a) croissance bactérienne
dans les systèmes chromogène et achrome

b) production en protéines

2.2. Production en pyoverdine totale :

Dans les milieux pauvres en substrat la croissance est accompagnée d'une forte synthèse de pyoverdine. L'apparition du pigment débute au milieu de la phase logarithmique, à un rythme très accéléré. Sa concentration devient maximale durant la phase stationnaire (Fig. 20, ci-dessous).

Dans les milieux achromes il y a apparition d'une substance incolore à fluorescence bleue. Les milieux ne deviennent jamais colorés. A la fin de la phase de vieillissement on note le jaunissement du milieu.

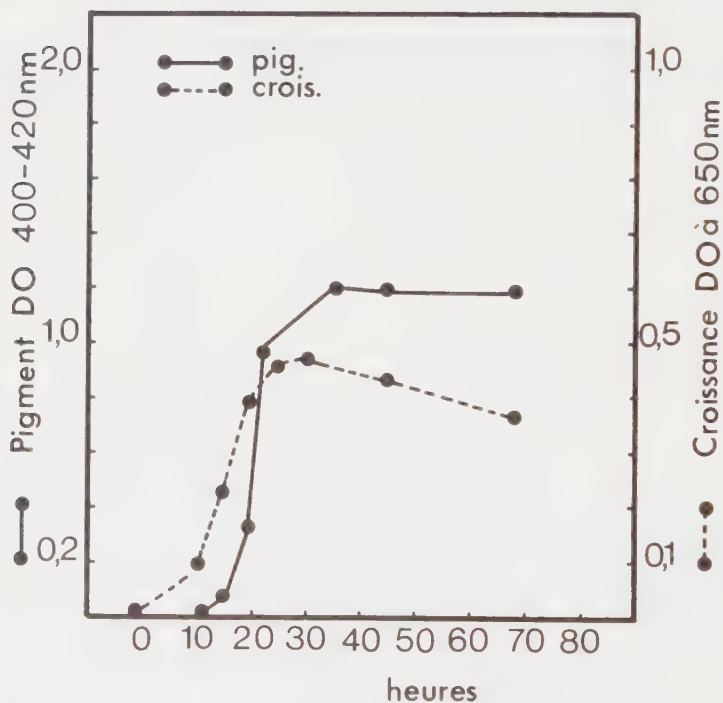


Fig. 20

Production en pyoverdine au cours de la croissance bactérienne.

2.3. Concentration des cytochromes :

Il est intéressant de connaître la variation de la concentration en cytochromes au cours de la croissance et sa relation avec la production de la pyoverdine dans le système chromogène (Fig. 21a, ci-après): une forte synthèse en pyoverdine coïncide avec une diminution considérable de la synthèse en cytochromes. Par contre, dans les milieux achromes, la quantité de cytochromes augmente tout au long de la phase exponentielle et tend vers une concentration constante au cours de la phase stationnaire (Fig. 21b, page 65).

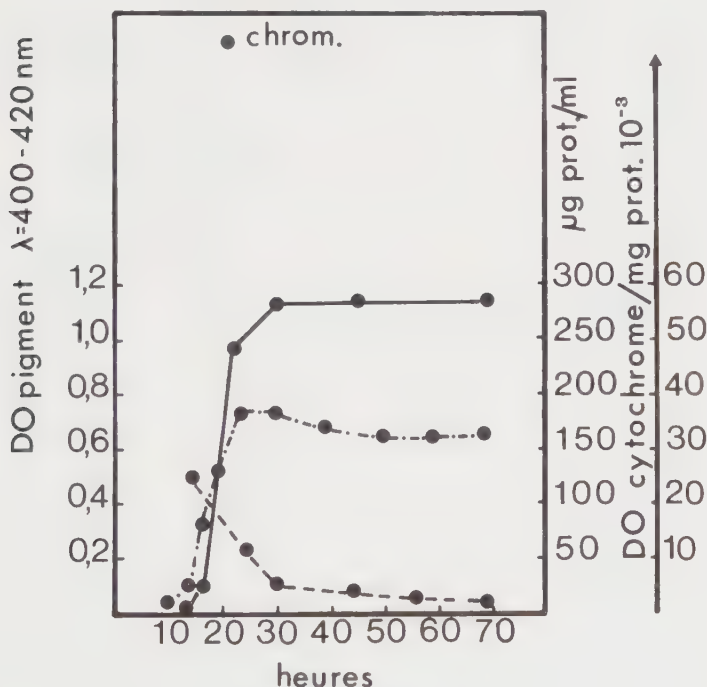


Fig. 21 a

Variation quantitative de cytochrome c au cours de la croissance (système chromogène)

— Pigment, -.-.- Protéine, ---- Cytochrome c

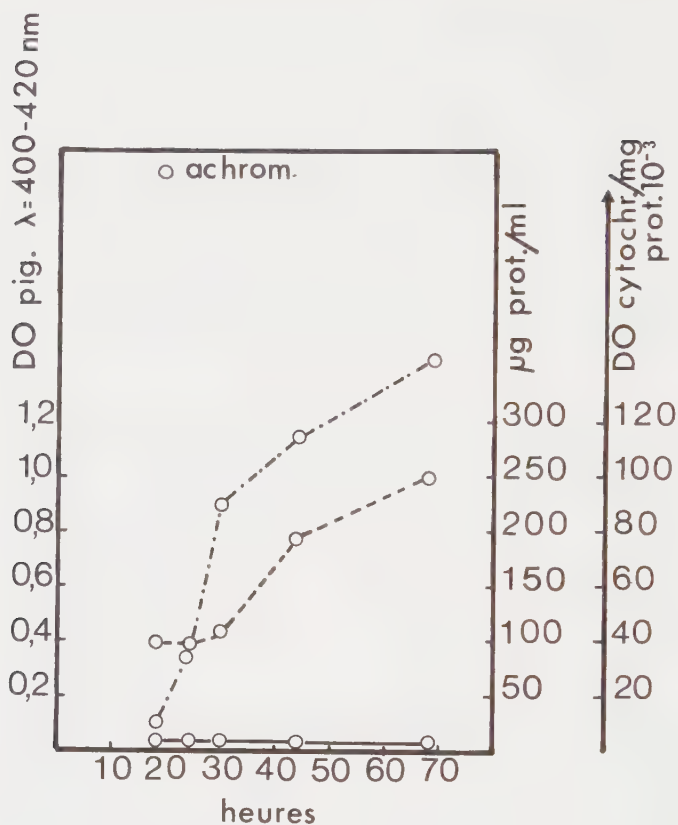


Fig. 21 b

Variation quantitative de cytochrome c au cours de la croissance (système achrome)

— Pigment, - · - · - Protéine, - - - Cytochrome c

2.4. Concentration d'adénosine triphosphate (ATP)

L'examen de la Fig. 22, ci-après, montre une concentration élevée en ATP dans le système achrome par rapport au système chromogène.

Les cellules en milieu riche manifestent un métabolisme endogène plus intense, en relation avec la concentration élevée d'ATP, que les cellules provenant des milieux de source d'énergie limitée.

Forrest et Walker (1965) observent le même phénomène chez *Streptococcus faecalis*. Dans le système achrome la chute de concentration d'ATP est très marquée. Chez *Ps. fluorescens* l'alternative respiratoire étant fortement influencée par le taux d'oxygène, la chute d'ATP dans le système achrome est sans doute la conséquence de l'augmentation du rapport oxygène/substrat (Greppin et Gouda, 1972).

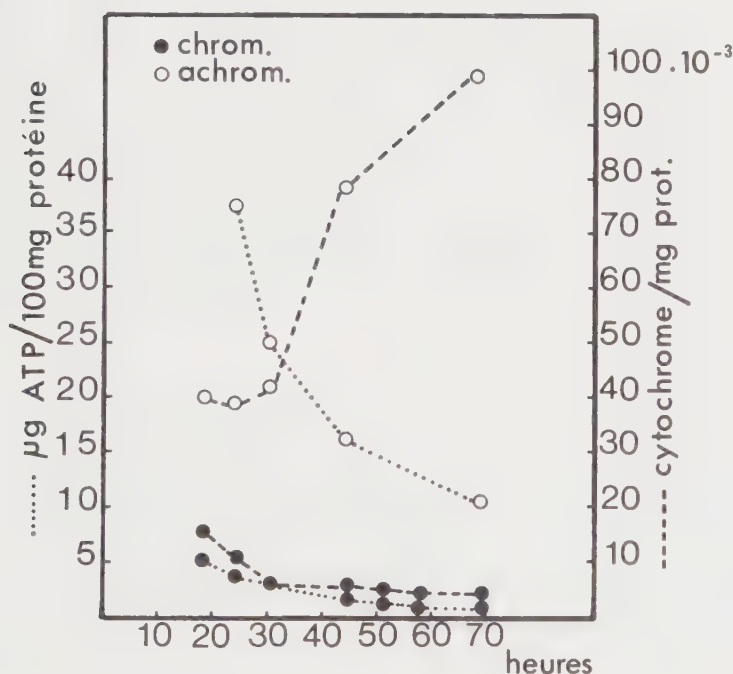


Fig. 22

Variation de la concentration en cytochrome c et en ATP au cours de la croissance

----- cytochrome c , ATP

3. Discussion

Les bactéries aérobies strictes se caractérisent par une grande variété de cytochromes, pigments appartenant au groupe des ferroporphyrine-protéines. Elles possèdent généralement plusieurs cytochromes et cytochromes oxydases.

Ps. aeruginosa contient les cytochromes du type a_1 , a_2 , b, c et c_1 (Horio, 1958). *Ps. fluorescens* possède des cytochromes de type b et c et ne contient pas de cytochrome oxydase (Stanier et Gunsalus, 1953), bien qu'à très forte concentration en substrat on observe une absorption dans la zone a (Greppin et Gouda, 1972). Une cytochrome c peroxydase dont le substrat spécifique est le cytochrome c a été découverte en 1956 par Lenhoff et Kaplan, dans des conditions de faible tension d'oxygène.

La diminution de la tension d'oxygène chez les bactéries aérobies strictes provoque une inhibition de la synthèse des cytochromes: mais certains microorganismes présentent un comportement paradoxal, c'est à dire que leur concentration en cytochromes augmente lorsque la pression d'oxygène baisse (Harrison et Pirt, 1967; White, 1963; Moss et al., 1969; Rosenberg et Kogut, 1958; Lenhoff et Kaplan, 1956; Gouda et Greppin, 1965).

Gouda et Greppin ont montré que l'oxygène n'est pas le seul facteur déterminant le changement respiratoire. C'est le rapport oxygène/substrat qui règle le choix de la voie respiratoire chez *Ps. fluorescens* ainsi que la vitesse de variation du nombre de germes en fonction du rapport oxygène/substrat.

Le système cytochromique a donc chez les microorganismes une nature adaptative. Les substrats oxydables ont une influence sur le contenu en différents cytochromes et nous avons montré que ceux-ci sont en relation avec la différence du taux de croissance bactérien. Une déviation de la synthèse des cytochromes est la conséquence d'un changement dans les voies métaboliques ainsi que l'apparition d'autres transporteurs d'électrons adaptés aux nouvelles conditions du milieu.

La production de pyoverdine, coïncidant avec la chute des cytochromes dans le système chromogène, est liée à un changement dans la composition de la chaîne respiratoire. Dans le système chromogène, du fait de l'alternative respiratoire, il y a baisse des catalases, peroxydases et cytochrome c peroxydase (Lenhoff et Kaplan, 1956; Greppin et Gouda, 1972). La pyoverdine possédant un pouvoir rédox semblable à celui du bleu de méthylène (Gouda, 1966), elle pourrait jouer éventuellement un rôle accessoire dans la chaîne respiratoire terminale non cytochromique.

Le système chromogène possède un métabolisme énergétique moins puissant que le système achrome. Nous l'avons montré par la mesure de la concentration en ATP et en protéines. Au début de la culture, le nombre de germes étant faible (concentration relative en substrat élevée), il y a adoption de la voie cytochromique. Au fur et à mesure de la multiplication, la baisse en nourriture oriente la bactérie vers le système respiratoire non cytochromique, d'où la raison d'une faible concentration en cytochromes.

Les bactéries achromes vivent dans un environnement riche et ne se soucient pas des problèmes de survie. Elles s'occupent essentiellement de l'augmentation de leur masse et de leur volume et accumulent des matières de réserve ! Elles possèdent un réservoir riche en énergie (ATP) et organisent leur programme de travail en conséquence.

CHAPITRE V

EVOLUTION DU COMPLEXE PIGMENTAIRE

La technique de séparation par filtration sur gel et l'emploi de substrats radioactifs nous ont permis de suivre, in vivo, l'évolution des diverses fractions du complexe pigmentaire. Dans ce chapitre nous décrirons :

1. Les résultats obtenus avec des milieux contenant du lactate d'ammonium 2 % et 15 %. Nous étudierons ensuite le passage du système chromogène au système achrome, en faisant varier la concentration en substrat nutritif.
2. Au moyen de glycine-2-C14 et d'acide succinique-2,3-C14, deux substrats chromogènes radioactifs, nous étudierons la cinétique de leur incorporation dans les diverses fractions.
3. L'emploi de l'acide Δ -aminolévulinique-4-C14, précurseur direct des noyaux pyrroliques, nous fournira des renseignements sur la présence éventuelle des pyrroles dans le complexe pigmentaire.
4. Dans la dernière partie, nous allons tenter de mettre en évidence la filiation existant entre les diverses fractions du complexe pigmentaire.

1. Apparition et évolution des fractions dans les milieux chromogène et achromogène

Les milieux de culture W (2 %) et W enrichi (15 %) ont été examinés à différentes phases de la croissance. Les surnageants ont été soumis à une séparation sur gel Sephadex, selon la méthode précédemment décrite. Les changements quantitatifs et qualitatifs observés pour les deux systèmes sont les suivants :

1.1. Système chromogène

Dans les premières heures qui suivent l'inoculation, le milieu reste incolore. Cependant, en lumière ultraviolette, nous observons une faible fluorescence bleue. Le chromatogramme indique une zone diffuse à fluorescence bleue. Nous n'obtenons pas de pics distincts.

. A partir de la 20^{ème} heure, dans la phase logarithmique de croissance, le milieu devient jaune-verdâtre et présente une vive fluorescence bleu-vert. Le chromatogramme indique la présence de toutes les fractions, avec prédominance de F_2 (fluorescence bleu-vert).

. A la fin de la phase logarithmique, la couleur du milieu de culture est nettement jaune-vert avec une vive fluorescence verte. La fraction 3 à fluorescence verte prédomine.

. A la fin de la phase stationnaire, la couleur du milieu est jaune, la fraction 4 de couleur beige-marron à faible fluorescence vert-bleu prédomine. La fraction 1_a se forme surtout dans les cultures âgées.

Les résultats ci-dessus sont illustrés par la Fig. 23, page 71, montrant l'évolution du complexe pigmentaire dans un système chromogène.

Le maximum d'absorption dans le visible (surnageant) est à 400 nm au début de la phase logarithmique et évolue jusqu'à 430 nm. Puis, lors du vieillissement, il subit une régression (Greppin, 1965) vers les longueurs d'ondes courtes (405 nm).

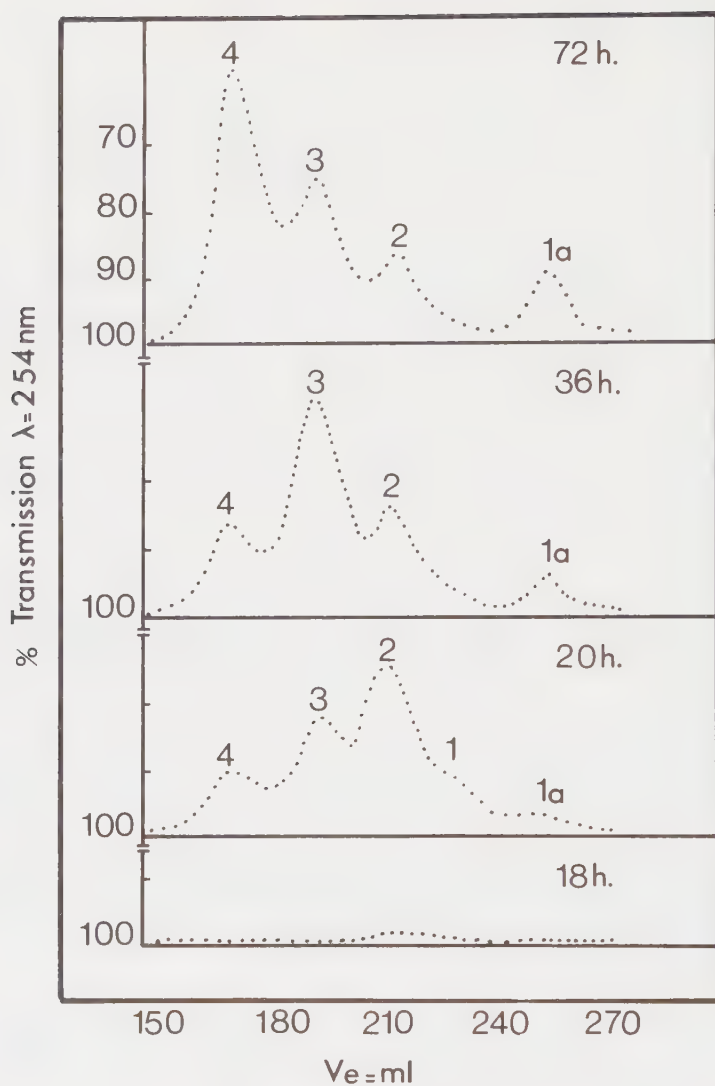


Fig. 23

Cinétique d'apparition des différentes fractions dans le système chromogène

Milieu = W $t = 25^{\circ}\text{C}$

Séparation par filtration sur gel Sephadex G-15

Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$

1.2. Système achrome

Dans un milieu de culture riche en lactate d'ammonium et en fer, *Ps. fluorescens* produit une grande quantité de cytochromes et a une couleur rose-brun. Le surnageant reste incolore durant toute la phase logarithmique et devient jaunâtre au cours de la période de vieillissement. L'examen en lumière ultraviolette indique une fluorescence bleue.

Les chromatogrammes des surnageants prélevés aux différentes phases (Fig. 24, page 73) présentent des pics comparables, au point de vue du volume d'élution, aux fractions 1_a et 4 et se rapportent à F_1 quant à leur spectre d'absorption. Les fractions 2 et 3 restent entièrement absentes. Les fractions 1_a et 4 sont incolores, possèdent une très faible fluorescence bleue et n'absorbent pas dans le visible.

Si les fractions 2 et 3 restent absentes dans le milieu achrome, par contre, une ou plusieurs fractions jaune-verdâtre à faible fluorescence verdâtre désignées par F_X sont synthétisées. La concentration de celles-ci augmente au cours de la croissance (sous-produits du métabolisme des porphyrines ?).

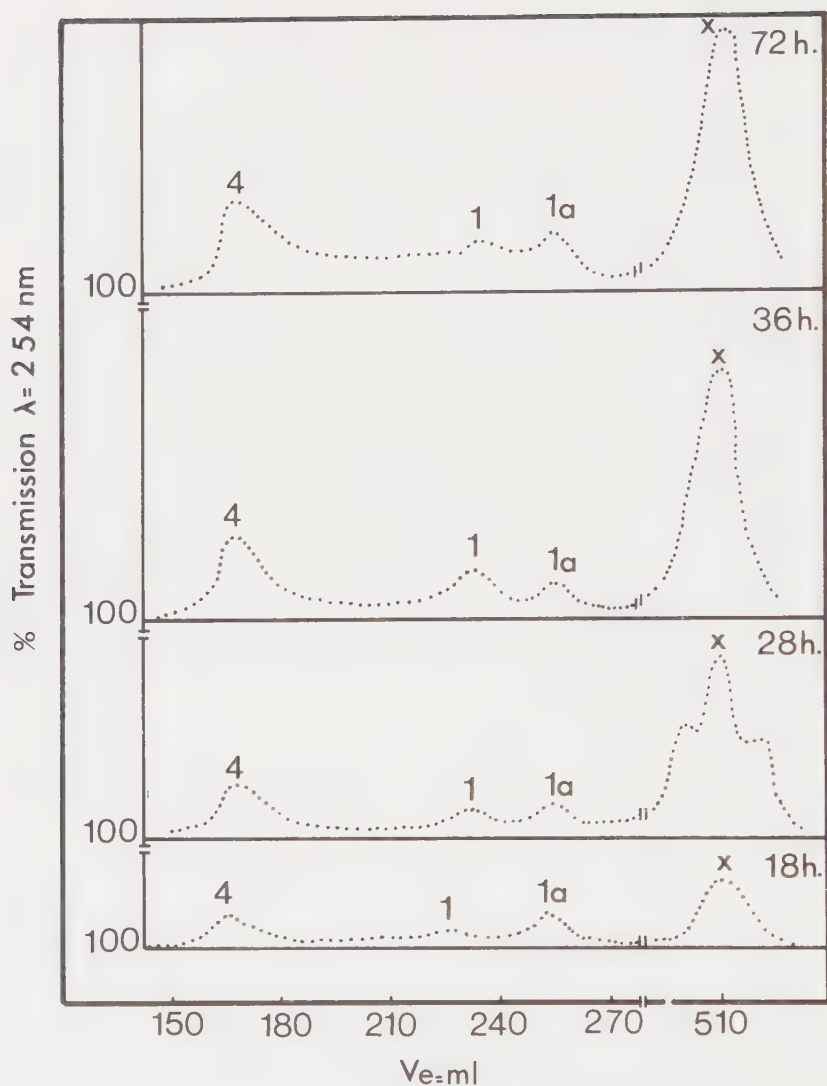


Fig. 24

Cinétique d'apparition des différentes fractions dans le système achrome

Milieu = W enrichi (15 %) $t = 25^{\circ}\text{C}$

Séparation par filtration sur gel Sephadex G-15

Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2}\text{M}$.

1.3. Passage du système chromogène au système achrome

Cette expérience nous renseigne sur la relation entre la concentration en substrat nutritif et la synthèse des fractions 2 et 3. Pour la réaliser nous avons enrichi les milieux W en lactate d'ammonium 4 % et 8 %.

Nous avons chromatographié les surnageants des milieux 2, 4, 8 et 15 % après 38 heures d'incubation.

A une concentration de 4 % la synthèse de F_2 et de F_3 est inhibée (Fig. 25, page 75) La concentration de F_1 reste élevée et il y a genèse de la fraction X. A partir d'une concentration de 8 %, F_1 diminue et F_2 et F_3 restent absentes. La concentration de F_X est liée à la concentration en substrat nutritif.

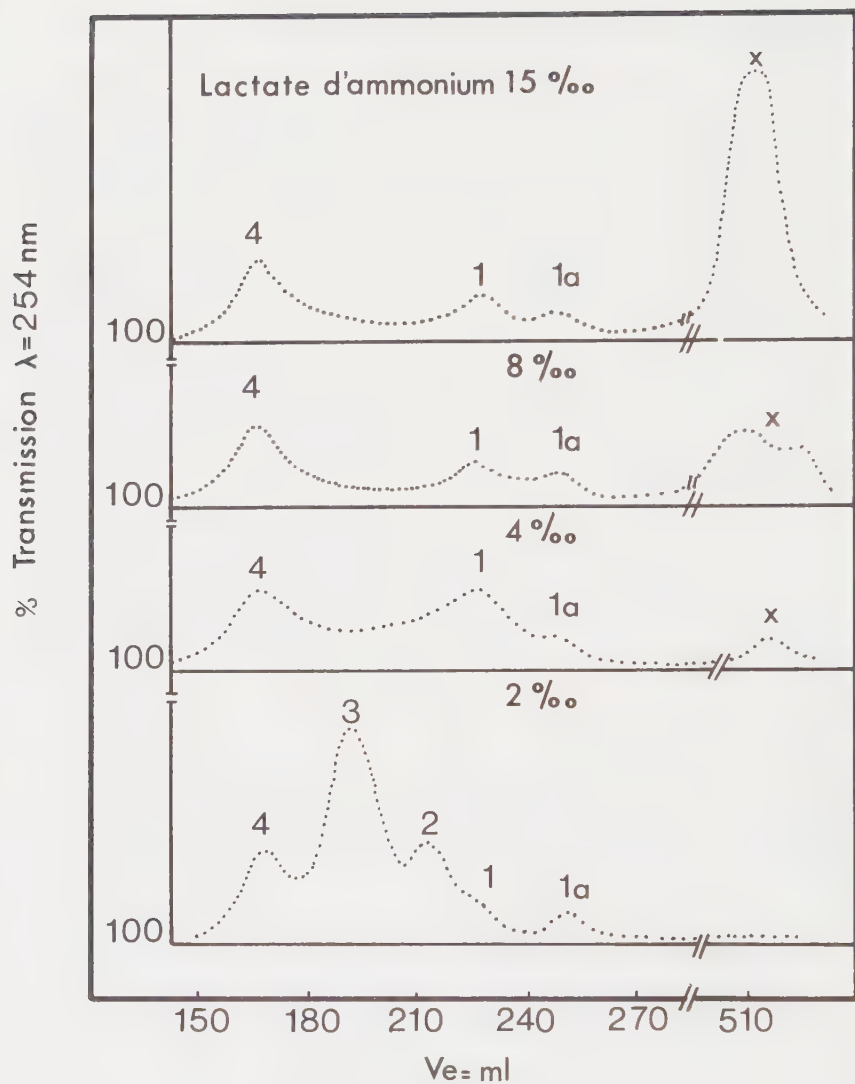


Fig. 25

Variation qualitative et quantitative du complexe pigmentaire en relation avec la concentration en lactate d'ammonium.

Séparation par filtration sur gel Sephadex G-15

Eluant = $\text{NH}_4\text{OH } 10^{-2} \text{ M}$.

1.4. Discussion

1.4.1. Dans le système chromogène nous observons un changement quantitatif des fractions du complexe pigmentaire. F_1 , F_2 et F_3 caractérisent une culture jeune. F_4 et F_{1a} par contre sont des caractéristiques d'une culture âgée. La diminution de F_2 dans la phase logarithmique correspond à une augmentation nette de F_3 . L'augmentation de F_4 et F_{1a} correspond à une diminution de F_3 . Cette variation d'équilibre des fractions dans le milieu de culture est d'ailleurs visible: en effet, il y a déplacement du spectre d'absorption du surnageant (voir Fig. 11, page 47).

Lorsque la concentration en F_3 devient élevée, le maximum d'absorption se déplace vers les grandes longueurs d'ondes (400 $\rightarrow$ 430 nm). Puis dans la phase de vieillissement, lorsque F_4 prédomine, le maximum se situe à 405 nm.

Ces observations sont en faveur d'une relation étroite entre les diverses fractions du complexe pigmentaire. Dans les pages suivantes nous allons aborder le problème de la filiation de ces fractions et leur transformation au cours du temps.

1.4.2. L'inhibition de la synthèse de F_2 et de F_3 dans le système achrome semble être sous la régulation de la concentration en substrat nutritif. Il faut cependant noter que la concentration en fer joue un rôle tout aussi important. Nous avons, dans le premier chapitre, mis en évidence le rôle de ce métal dans l'inhibition de la synthèse en pyoverdine. Le fer exerce le rôle de répresseur dans la synthèse du pigment, précisément au niveau F_2 et F_3 .

1.4.3. Lors de l'utilisation de lactate d'ammonium à 4 ‰, F_1 s'accumule dans le milieu. On peut supposer que sa transformation en F_2 est bloquée. A une concentration plus élevée (8 ‰), on observe une répression partielle de F_1 . D'une manière générale, à partir d'une concentration de 8 ‰, la synthèse de F_1 , F_4 et F_{1a} est aussi réprimée.

L'absence d'absorption dans le visible de F_4 est probablement due à un manque de liaison avec une molécule provenant de F_3 . La synthèse de cette dernière étant inhibée, la structure de F_4 et par conséquent ses caractéristiques

restent différentes de celles produites dans le système chromogène.

En conclusion, le système chromogène contient :

$$F_1, F_2, F_3, F_4 \text{ et } F_{1a}$$

le système achrome contient :

$$F_1, -, -, F_{(4)}, F_{(1a)}$$

2. Apparition et évolution des fractions du complexe pigmentaire en présence de substrats chromogènes radioactifs

Nous avons réalisé quelques expériences préliminaires sur le mécanisme biochimique de la formation de la pyoverdine, en introduisant dans le milieu de culture W de l'acide succinique-2,3- C^{14} et de la glycine-2- C^{14} .

Nous avons étudié comparativement l'incorporation de ces deux substrats en ajoutant dans les milieux de culture correspondants une quantité identique d'élément radioactif (500 nCi/50 ml). Au cours de la croissance, le surnageant des deux types de culture est chromatographié sur Sephadex et 2 ml de chaque fraction sont analysés dans un scintillateur pour l'activité en C^{14} .

2.1. Incorporation de l'acide succinique-2,3- C^{14}

L'ordre d'apparition des fractions est le suivant :

- . Apparition de marquage, dès la 10^{ème} heure, dans F_1 , puis dès la 12^{ème} heure dans F_2 (soit dans la phase latente de croissance). Les chromatogrammes ne manifestent aucune absorption en U.V. pendant cette période.
- . A partir de la 18^{ème} heure (début de la phase logarithmique) les fractions 1 et 2 atteignent un maximum d'activité et nous observons l'apparition de la fraction 3.
- . Après 24 heures de culture (milieu de la phase logarithmique) toutes les fractions sont représentées. Les fractions 1 et 2 diminuent fortement au profit des nouvelles fractions 3 et 4. Ensuite, F_1 disparaît complètement et la fraction l_a continue à augmenter tout au long des périodes suivantes (Fig.26, 27 et 28, pages 79 à 81).

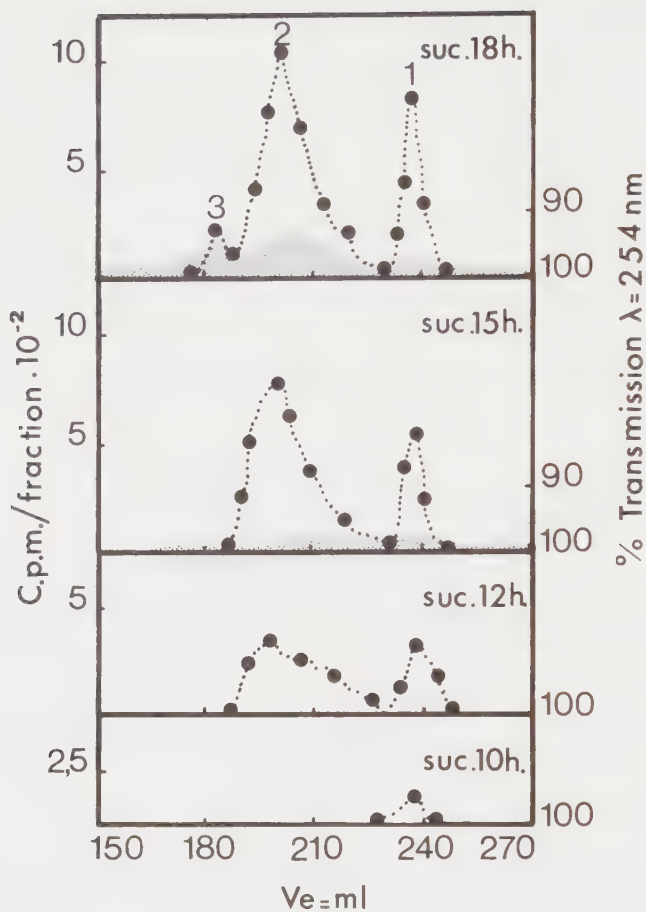


Fig. 26

Apparition successive des fractions du complexe pigmentaire
(acide succinique-2,3-C14) au cours de la croissance

Milieu = W

$t = 25^{\circ}\text{C}$

●---● C14

▨ transmission à 254 nm.

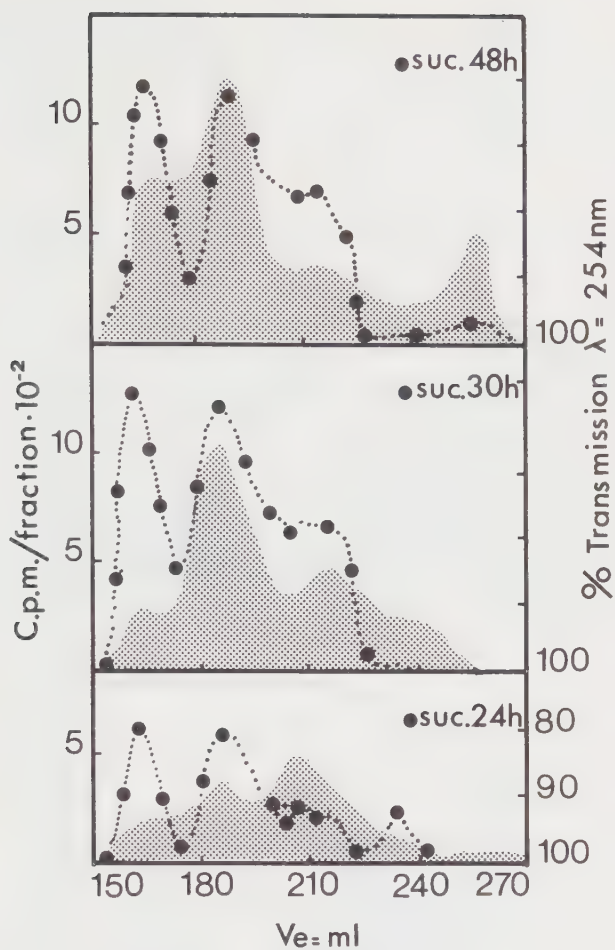


Fig. 27

Apparition successive des fractions du complexe pigmentaire
(acide succinique-2,3- $C14$) au cours de la croissance

Milieu = W

$t = 25^{\circ}\text{C}$

●.....● $C14$

▨ transmission à 254 nm.

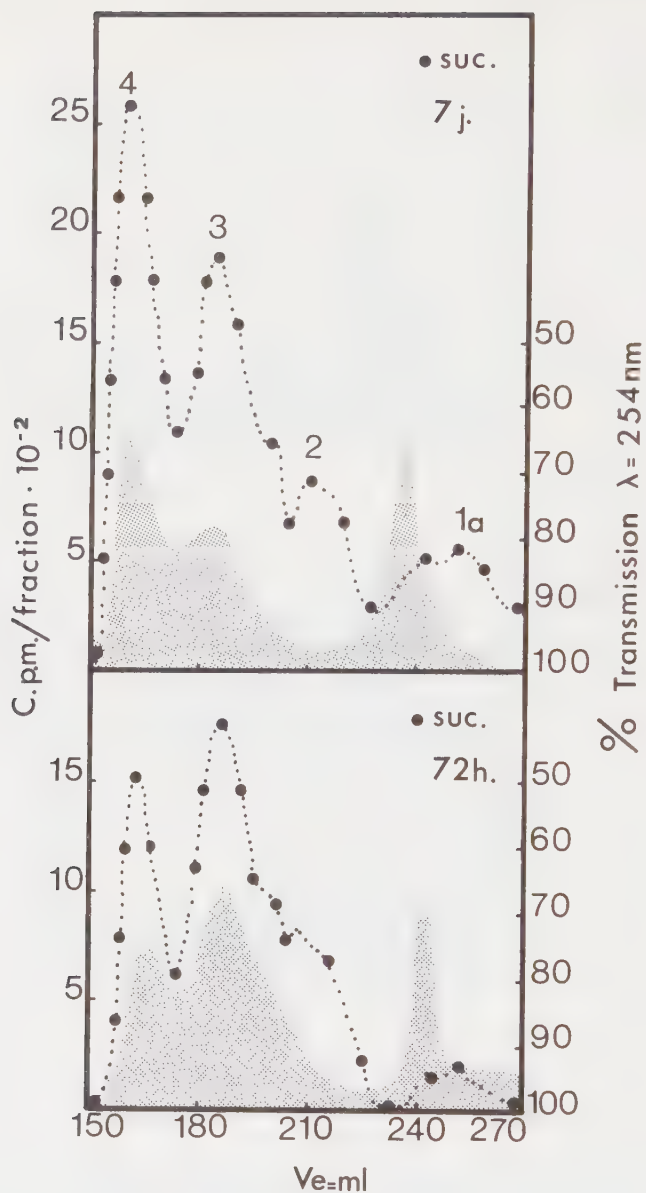


Fig. 28

Apparition successive des fractions du complexe pigmentaire
 (acide succinique-2,3-C14) au cours de la croissance

Milieu = W

t = 25°C

●.....● C14

stippled area transmission à 254 nm.

2.2. Incorporation de la glycine-2-C14

Les résultats des radiochromatogrammes (Fig. 29 et 30, pages 83-84) obtenus lors de l'utilisation de cet acide aminé confirment son rôle dans la synthèse de la pyoverdine:

- . L'ordre d'apparition des diverses fractions est identique à celui de l'expérience précédente.
- . L'incorporation de la glycine dans les fractions 1 et 2 est tardive. Ceci est probablement dû à un phénomène de perméabilité et d'induction enzymatique.
- . La radioactivité de la fraction 1_a est beaucoup plus forte en présence de glycine-2-C14 qu'en présence d'acide succinique-2,3-C14. Cette fraction se présente sous forme de deux pics mal séparés et se forme déjà au début de la phase logarithmique.

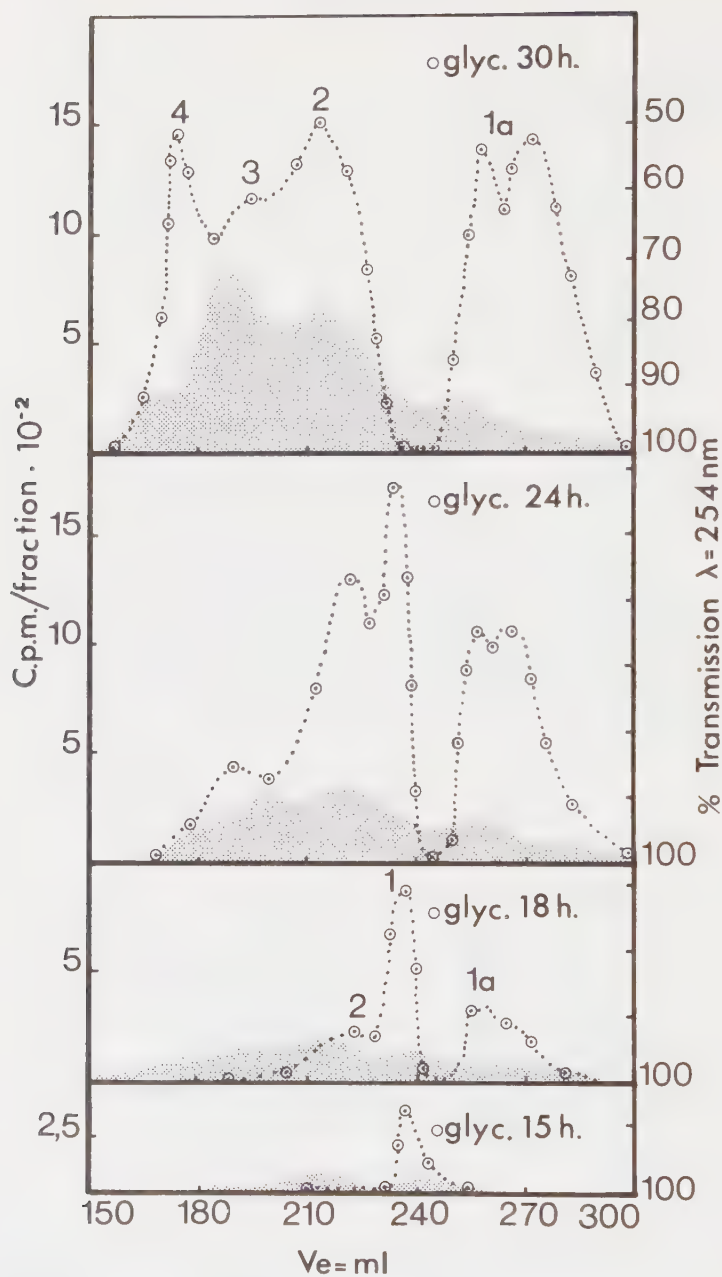


Fig. 29

Apparition successive des fractions du complexe pigmentaire
(glycine-2-C14) au cours de la croissance

Milieu = W

$t = 25^{\circ}\text{C}$

○.....○ C14

■ transmission à 254 nm.

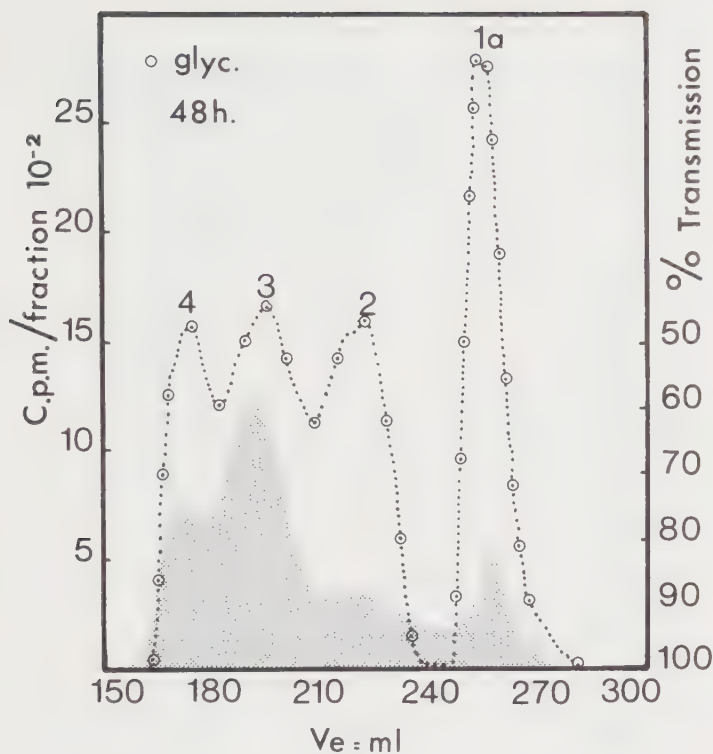


Fig. 30

Incorporation de la glycine-2-C14 dans les diverses fractions du complexe pigmentaire après 48 heures de culture

Milieu = W

t = 25°C

○.....○ C14

▨ transmission à 254 nm.

2.3. Discussion

La cinétique de marquage des diverses fractions par la glycine-2- C^{14} et l'acide succinique-2,3- C^{14} nous indique un parallélisme dans la participation de ces deux substrats à la synthèse du complexe pigmentaire (Fig. 31 ci-dessous, Fig. 32 page 86).

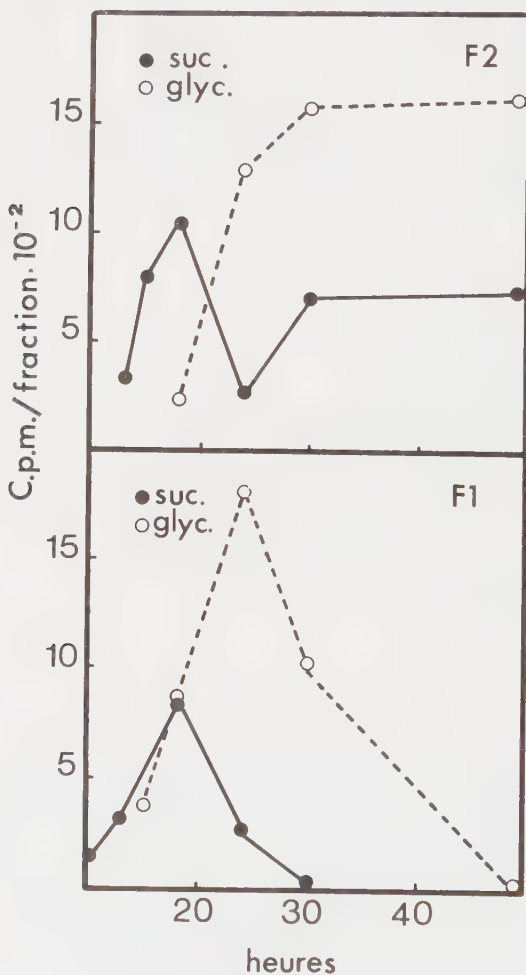


Fig. 31

Evolution de la radioactivité des fractions 1 et 2 dans le milieu W.

○-----○ Glycine , ●-----● Succinate

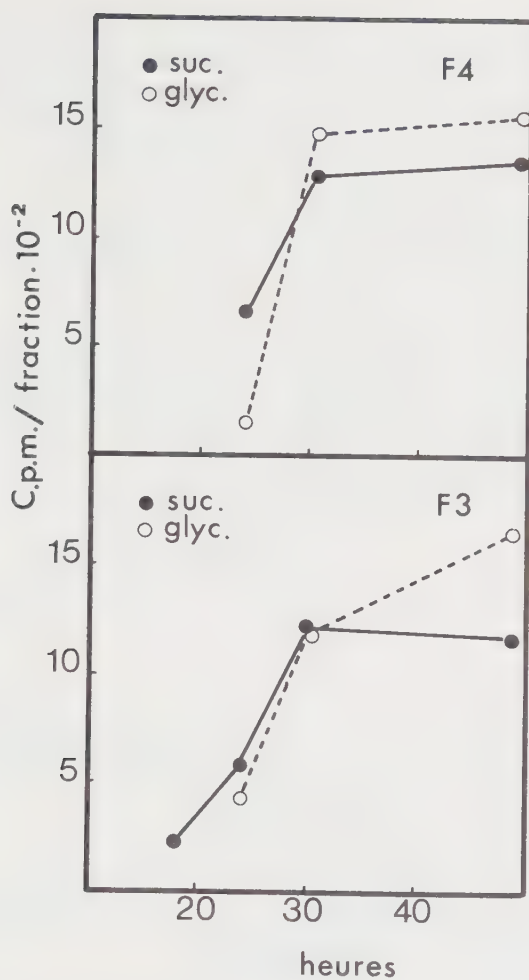


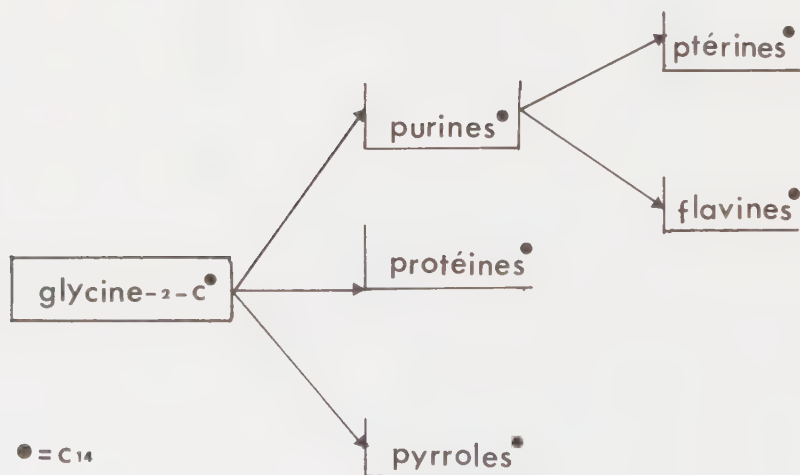
Fig. 32

Evolution de la radioactivité des fractions 3 et 4 dans le milieu W.

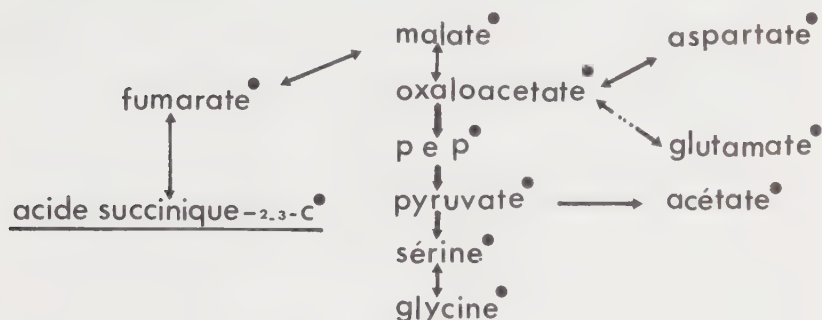
○---○ Glycine , ●---● Succinate

Ces expériences nous fournissent des renseignements en ce qui concerne la filiation entre les diverses fractions et la nature chimique du complexe pigmentaire. Les structures ptérinique, flavinique, pyrrolique ou peptidique ont été postulées pour le pigment de *Ps. fluorescens* et *Ps. mildenbergii*. L'analyse des voies métaboliques de la glycine et du succinate aboutissant à la synthèse des structures mentionnées ci-dessus nous permettra d'approcher le problème de la nature chimique de la pyoverdine.

2.3.1. La glycine-2-C14 entre telle quelle dans la synthèse des protéines, des pyrroles et des purines. Ces dernières sont des précurseurs des flavines et des ptérines (Albert, 1957; Mac Nut, 1956; Vieira et Shaw, 1961). L'emploi de la glycine-2-C14 n'est donc pas propice à la détermination de la nature du pigment.



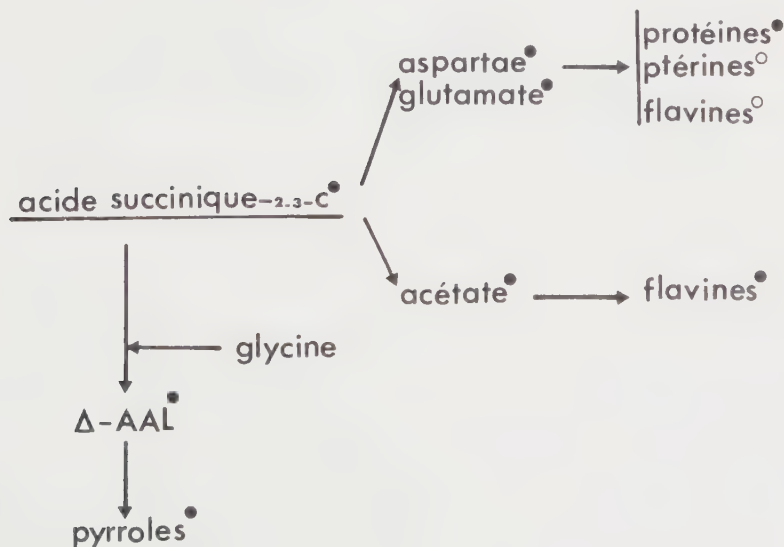
2.3.2. L'acide succinique-2,3-C¹⁴ participe à la formation de plusieurs molécules métaboliquement importantes. Ce sont : l'acide acétique, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la glycine.



p e p = phosphoénolpyruvate

• = C¹⁴

D'autre part, ces produits formés sont très actifs dans la synthèse des protéines, pyrroles, ptérines et flavines.



Au moyen de l'acide succinique-2,3-C14, les différents pigments seront aussi radioactifs et la détermination de la nature du complexe pigmentaire n'est pas possible. Il faut noter que l'acide succinique marqué par le tritium sur les groupements méthylène fournit des produits qui seront marqués différemment. Les quatre hydrogènes des deux groupements se trouvent répartis au cours des différentes réactions de deshydrogénation et d'hydratation du cycle de TCA. C'est ainsi que l'acide acétique sera marqué par un seul atome d'hydrogène et la glycine par aucun. Il y a donc le problème de la dilution isotopique : les pyrroles seront fortement marquées, les protéines et les flavines faiblement, les ptérines ne seront pas marquées du tout.

Nous avons fait quelques essais avec de l'acide succinique tritié. Les diverses fractions obtenues sont radioactives avec, comparativement à l'emploi en C14, une plus forte radioactivité sur les fractions 1_a et 4. Si ceci semble exclure l'existence des ptérines, il nous reste la possibilité d'une nature soit flavinique, soit pyrrolique et protidique. Selon Elliott (1958) et Gouda (1966), la pyoverdine n'a pas de similitude avec les pigments flaviniques. Les spectres d'absorption de ces deux pigments ne sont pas comparables.

Il nous reste deux possibilités : structure pyrrolique et protidique. En ce qui concerne l'existence des noyaux pyrroliques, l'incorporation de la glycine-2-C14 et de l'acide succinique-2,3-C14 dans les diverses fractions ne la prouve pas nécessairement. Nous allons étudier l'incorporation d'un précurseur direct des pyrroles : l'acide Δ -aminolévulinique-4-C14.

3. Incorporation de l'acide Δ -aminolévulinique-4-C14

Nous avons introduit cet acide dans les milieux de culture W, puis nous avons examiné les surnageants prélevés à trois stades de croissance. Les radiochromatogrammes (fig. 33 et 34, pages 91-92) mettent en évidence les points importants suivants :

- . l'acide Δ -aminolévulinique est rapidement absorbé par les bactéries
- . son taux d'incorporation est très élevé en comparaison de celui de la glycine et de l'acide succinique.
- . le renouvellement des fractions 1, 2, et 3 est très rapide; l'activité en C14 se trouve essentiellement dans les fractions 4 et 1_a (stade final de l'évolution du complexe pigmentaire).

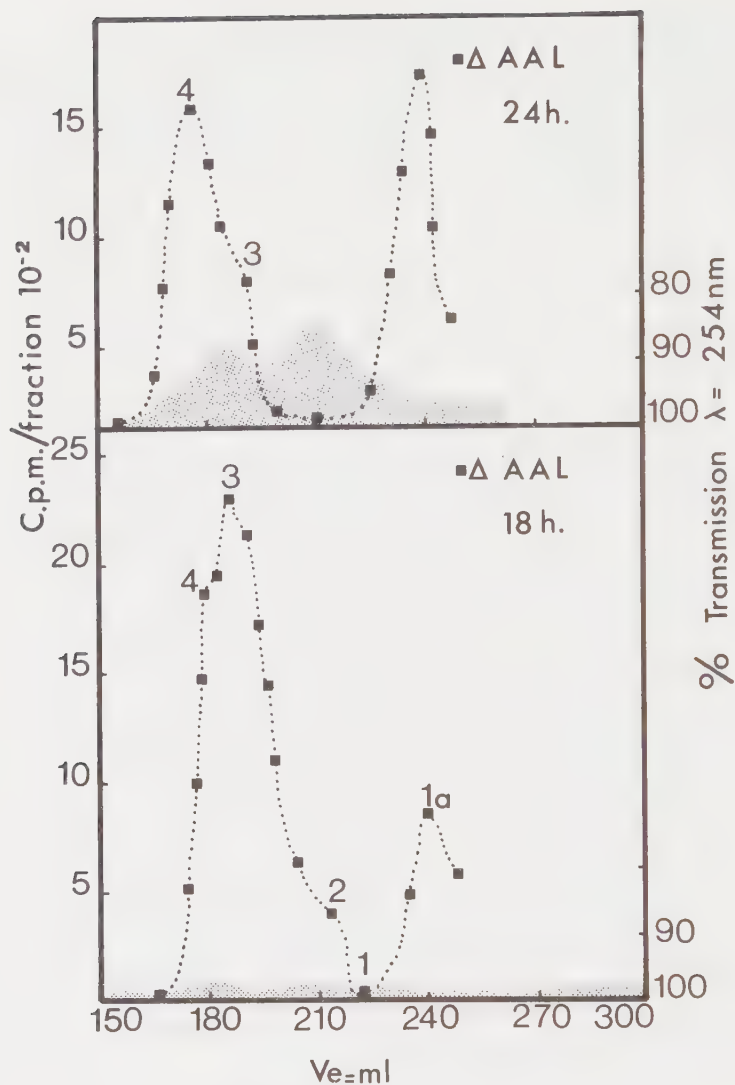


Fig. 33

Incorporation de l'acide Δ -aminolévulinique-4- C^{14} dans les diverses fractions du complexe pigmentaire au cours de la croissance

Milieu = W

t = 25°C

$\blacksquare \cdots \cdots \blacksquare$ C^{14}

shaded area transmission à 254 nm.

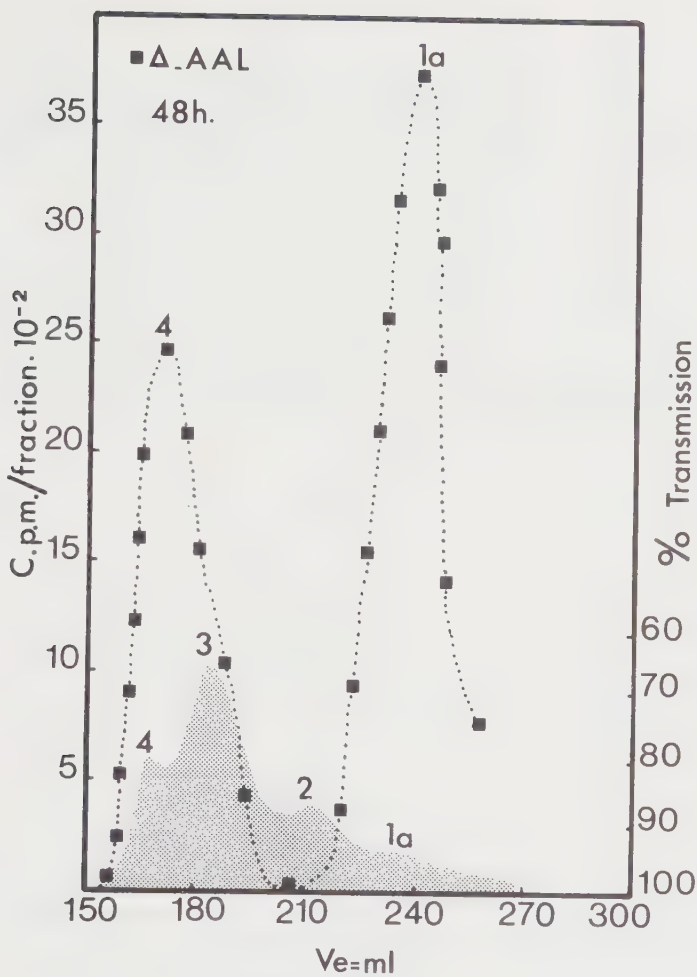


Fig. 34

Incorporation de l'acide Δ -aminolévulinique-4-C14 dans les diverses fractions du complexe pigmentaire au cours de la croissance

■·····■ C14 , ▨ Transmission à 254 nm.

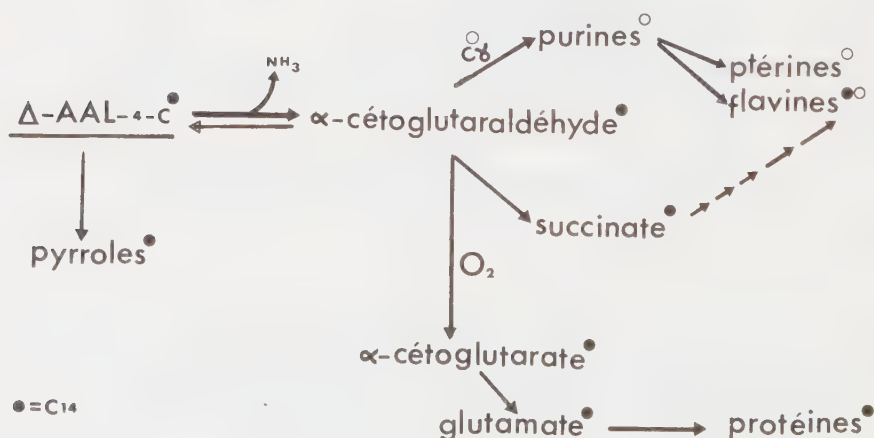
3.1. Discussion

L'analyse des voies métaboliques du Δ -AAL-4-C14 nous montre que cet acide n'est pas uniquement le précurseur des noyaux pyrroliques. Il peut donner naissance également aux acides aminés (Shemin, 1955).

Le Δ -AAL-4-C14 entre dans le cycle de Shemin, puis, sous l'action d'une transaminase, il se transforme en α -cétoglutaraldéhyde radioactive en -4-C14. Le C₈ de ce dernier participe à la biosynthèse des purines, précurseurs des ptérines et des flavines. L' α -cétoglutaraldéhyde se transforme en acide α -cétoglutarique, un intermédiaire important dans la formation de l'acide glutamique.

Le schéma suivant nous indique que :

- les ptérines et les flavines formées à partir du noyau purique ne sont pas radioactives,
- les protéines formées par l'intermédiaire de l'acide glutamique sont radioactives,
- les pyrroles sont également radioactives.



L'existence de noyaux pyrroliques dans les divers pigments bactériens est bien connue. Chez *Serratia marcescens*, la prodigiosine est un pigment tripyrrolique. Elle existe sous forme d'un complexe glycoprotéique soluble, localisé à la surface cellulaire, et le Δ -AAL-4-C14 ne semble pas être un précurseur de ce pigment (Cruz-Camarillo, 1968; Hubert et Potter, 1969).

Chez *Ps. Roseus fluorescens*, les ferrosamine, proferrosamine et apoferrosamine sont des acides aminés pyrroliques associés à un noyau de pyrimidine (Marchal, 1956; Pouteau-Thouvenot, 1965, 1968, 1969).

Ainsi l'emploi de Δ -AAL-4-C14 indique soit la présence de protéines, soit celle de pyrroles. L'existence d'une protéine conjuguée aux pyrroles n'est pas exclue.

4. Relation entre les diverses fractions

4.1. Notion de dualité et d'unicité

Les travaux de Giral (1936) et de Naves (1955) ont mis en évidence l'existence de deux substances possédant des caractéristiques différentes. Ces deux substances ont été respectivement appelées : composante I, de coloration brune et de fluorescence bleue et composante II, de coloration jaune-verdâtre et de fluorescence verte. Naves observe que la composante I se rapproche des ptérines et que la composante II pourrait être soit une ptérine, soit une flavine.

Cette hypothèse émise en faveur de la dualité du pigment est fondée sur la fluorescence et la couleur des deux composantes. En 1966 la séparation du complexe pigmentaire en cinq fractions et la démonstration in vitro par Gouda d'une filiation entre ces fractions ont changé la notion de dualité pigmentaire. Gouda émet l'hypothèse de la biogenèse du complexe pigmentaire à partir d'un précurseur commun.

4.2. Afin de pouvoir vérifier *in vivo* la relation entre les fractions du complexe pigmentaire, nous avons réalisé l'expérience suivante :

Les cinq fractions radioactives séparées par chromatographie sur gel ont été purifiées par un deuxième passage sur colonne et ont été ajoutées respectivement à cinq milieux W non radioactifs. Après 24 heures d'incubation, l'activité en C14 des pigments synthétisés "de novo" a été analysée (Tableau 9 ci-après).

Tableau 9 - Etude *in vivo* de la filiation des fractions marquées

Fraction administrée (cpm)	cpm/ml de fraction, après 24 h d'incubation					cpm/protéine totale %
	1	2	3	4	1 _a	
1 50.000	1400	1105	389	176	85	17 %
2 60.900	-	3080	1500	460	100	9 %
3 90.400	-	1124	3750	845	208	5 %
4 70.200	-	-	-	6000	300	0.0 %
1 _a 30.1000	-	-	-	102	2800	0.0 %

Ces résultats nous montrent que :

- . les fractions 1, 2 et 3 sont absorbées par les bactéries,
- . les fractions 4 et 1_a ne sont pas absorbées. La fraction 4 inhibe même le développement bactérien et pourrait être un produit toxique de dégradation (antibiotique ?),
- . la fraction 1 donne naissance à toutes les autres fractions,
- . les fractions 2 et 3 donnent naissance à toutes les fractions, sauf à F₁,
- . les fractions 4 et 1_a ne participent pas à la formation des autres fractions.

4.3. Discussion

Les résultats obtenus lors des expériences précédentes sur des milieux chromogène et achrome nous indiquaient une répression de la synthèse de F_2 et F_3 dans le système achrome. Par contre, dans le système chromogène, *Ps. fluorescens* possède l'équipement enzymatique pour la formation de ces fractions (F_2 et F_3). Le rôle du Mg^{++} et du Zn^{++} a été signalé par Gouda (1966) et Baghdiantz (1953), concernant la fluorescence bleue et la fluorescence verte. Lorsque la concentration en substrat nutritif augmente, nous avons constaté l'accumulation de F_1 . Cela laisse supposer que sa transformation en F_2 n'est pas réalisée. Nous avons vu aussi au cours des expériences avec les substrats radioactifs que la fraction 1 est synthétisée toujours en premier et F_2 en second. Ces résultats sont en faveur de la transformation de F_1 en F_2 , de même que le changement des propriétés spectrales. La réaction enzymatique semble être catalysée par le Zn^{++} .

La participation de la glycine et du succinate à la formation des diverses fractions apporte des éléments en faveur d'une voie de biosynthèse commune. La première molécule formée, soit la fraction 1, serait l'état initial commun et les fractions 2 et 3 seraient les intermédiaires. La molécule formée tardivement, F_4 , serait le produit final de cette voie métabolique.

D'après les résultats que nous obtenons, nous proposons un schéma de filiation entre les diverses fractions du complexe pigmentaire. Ce schéma complète ceux de Gouda (1966) et de Greppin (1965).

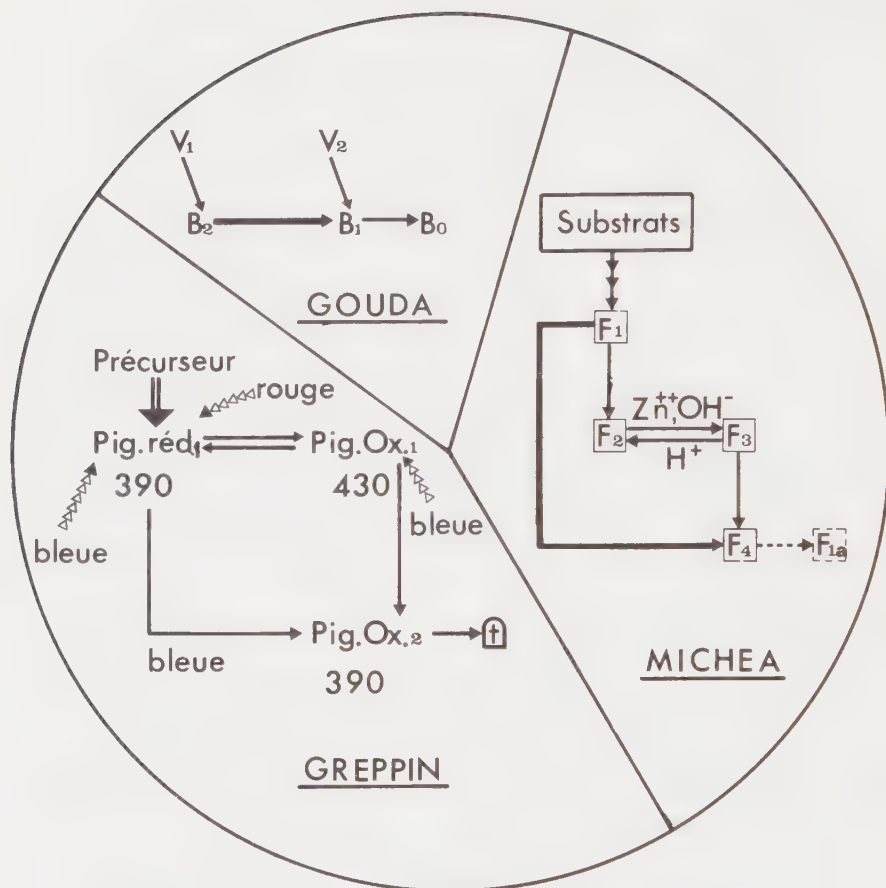


Schéma : Relation entre les diverses fractions du complexe pigmentaire.

Tableau 10 - Relation entre les diverses nomenclatures

Auteurs :	Gouda	Greppin	Michéa
Fractions:	-	Précurseur	F ₁
	V ₁	Etat red. ₁	F ₂
	V ₂	Etat ox. ₁	F ₃
	B ₁	Etat ox. ₂	F ₄
	B ₂	-	-
	B ₀	-	F _{1a}

Gouda met en évidence une filiation pour les formes plutôt dégradées. Ses expériences ont été effectuées sur une culture âgée de cinq jours. Cependant cet auteur mentionne que : "V₁ et V₂ sont trop voisins l'un de l'autre pour être distingués in vivo. Nous ne pouvons pas affirmer leur existence simultanée dans les milieux de culture".

Greppin met en évidence une filiation pour les formes physiologiquement actives. Ce sont les formes red₁-ox₁ qui sont en équilibre.

Au moyen des substrats radioactifs, nous avons pu mettre en évidence la genèse et l'évolution de chaque fraction séparément :

- la première fraction synthétisée, F₁ est la molécule la plus légère; F₄, formée tardivement, est la plus lourde.
- l'ordre d'apparition des fractions radioactives et la transformation de l'une en l'autre, indique la filiation d'une voie métabolique,
- la participation des mêmes substrats à leur formation, la parenté spectrale des diverses fractions et la formation des unes à partir des autres indique l'existence d'une structure chimique commune.

- . Les substrats radioactifs, acide succinique tritié et Δ .AAL-4-C14 nous ont indiqué que le pigment n'est pas de nature ptérinique, ni flavinique.
- . il est possible que le pigment soit formé de deux parties : l'une peptidique, l'autre ayant des groupes chromophores, probablement de nature pyrrolique.

CHAPITRE VI

NATURE CHROMOPEPTIDIQUE

1. Quelques propriétés physico-chimiques de la pyoverdine

La grande affinité du pigment pour la phase aqueuse dans tous les systèmes d'extraction rend sa purification difficile. Par conséquent, ses propriétés physico-chimiques ne sont pas bien déterminées. Les efforts des différents chercheurs pour obtenir le pigment sous sa forme cristallisée ont été vains.

1.1. Solubilité

Le pigment est soluble dans l'eau, l'acide acétique, le phénol, la pyridine 80 % et le méthanol aqueux. Il est insoluble dans le chloroforme et les autres solvants organiques. L'acide phosphotungstique, l'eau de baryte et le baryum ont été utilisés pour la précipitation du pigment. (Turfreijer, 1941 et Giral, 1936).

1.2. Couleur et fluorescence

La couleur et la fluorescence du complexe pigmentaire produit par les Pseudomonadales varient avec le pH (Turfitt, 1936; Giral, 1936; Turfreijer, 1941; Wolf, 1950; Naves, 1955; Elliott, 1958; Osawa, 1963; Wasserman, 1965; Gouda, 1966; Newkirk et Hulcher, 1969; Favre, 1969).

Le maximum d'absorption à 420-430 nm est obtenu entre les pH 6.5 et 8.5 (Favre, 1969).

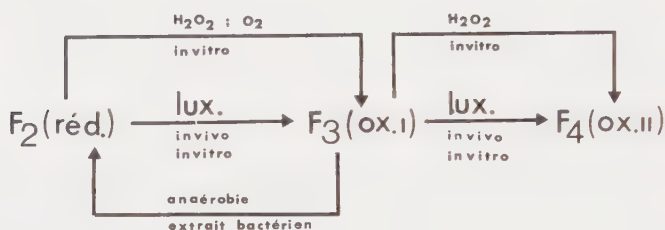
En milieu alcalin, le maximum d'absorption se déplace vers les grandes longueurs d'onde.

1.3. Oxydo-réduction

Les propriétés rédox du pigment ont été mises en évidence par plusieurs auteurs (Greppin et Gouda, 1965; Gouda, 1966; Favre, 1969).:

- Le pigment oxydé, F_3 (schéma ci-après) peut subir une réduction en anaérobiose, par un extrait bactérien (Gouda, 1966).

- . La lumière à faible dose oxyde le pigment réduit, état₁ en état₂ (OX_I) et, à forte intensité, l'oxyde en état₃ (OX_{II}). (Greppin, 1965).
- . Le pigment réduit s'oxyde lentement à l'air et très rapidement, mais d'une manière irréversible, avec l'eau oxygénée (Favre, 1969).
- . Le potentiel rédox du pigment est proche de celui du bleu de méthylène (Gouda, 1966).



1.4. Formule et structure

Turfreijer et coll. (1941) ont obtenu une poudre brune de formule $C_{32}H_{41}O_8N_7$ (PM = 651,4). Selon ces auteurs, le noyau responsable de la fluorescence contient probablement un atome d'oxygène et un noyau hétérocyclique, avec deux atomes d'azote.

Différentes structures ont été postulées pour les pigments fluorescents verts isolés chez *Ps. fluorescens*, *Azotobacter vinelandii* et *Ps. mildenbergii* :

- . ptérine et flavine (Giral, 1936; Wolf, 1951; Naves, 1955; Chakrabarty, 1964)
- . riboflavine (Birkhofer et Birkhofer, 1948)
- . pyrrole (Lenhoff, 1963; Gouda, 1966)

. peptide (Bulen et Le Comte, 1962; Love et Hulcher, 1964; Newkirk et Hulcher, 1969; Winters et Corpe, 1971).

1.5. Point de fusion

Les fractions 2, 3 et 4, obtenues par la séparation sur gel Sephadex ont été lyophilisées et présentent un aspect amorphe, respectivement de couleur blanche, jaune et brune.

Aucune fraction n'a un point de fusion net. La fusion des fractions 3 et 4 débute à 185°C et se continue jusqu'à 290°C, en laissant un résidu brun-noir.

Après une calcination à 500°C, on obtient une cendre insoluble dans l'eau et soluble dans l'acide acétique dilué. Il s'agit probablement des métaux alcalins.

2. Analyses chimiques

2.1. Nous avons analysé les fractions 3 et 4 lyophilisées pour leur contenu en C, H et N. Le tableau 11 ci-après représente nos résultats, comparés à ceux des différents auteurs.

Tableau 11 - Résultats des analyses chimiques

Auteurs	% C	% H	% N	% O
Michéa : F ₃	45.66	7.23	11.50	35.61
Michéa : F ₄	46.17	7.68	11.89	34.26
Turfitt (1936)	49.40	7.38	13.16	29.87
Turfreijer (1941)	58.95	6.34	15.05	-
Chakrabarty (1964)	44.83	6.25	13.05	-

Nos résultats sont très proches de ceux obtenus par Turfitt sur la poudre brune amorphe, isolée des cultures âgées de *Ps. fluorescens*.

Tableau 12 - Réactions utilisées pour une estimation qualitative du pigment

Nom de réaction	réactif	fractions	
		3	4
Millon	HgNO ₃ /ac. nitrique	+	+
Ehrlich	P-diméthylaminobenzaldéhyde/ HCl 5 N	-	+
Folin-Ciocalteu	Ac. phosphomolybdotungstique	++	++
Biuret	Sulfate de Cu/NaOH	+	+
Ninhydrine	Tricéthohydrindène	-	-

Le résultat de ces réactions ainsi que le comportement du complexe pigmentaire vis-à-vis des différents éluants et des différents pH (Fig.6, page 35) de même que la migration vers la cathode et l'anode, mettent en évidence l'existence de molécules chargées, probablement de nature peptidique. Nous avons donc entrepris certaines recherches préliminaires dans ce domaine.

2.2. Analyse des acides aminés

Elle comprend deux étapes :

- . Hydrolyse de la fraction 3
- . Estimation qualitative et quantitative des produits hydrolysés.

2.2.1. La fraction 3 a été hydrolysée selon la méthode décrite précédemment. La séparation sur Sephadex G-15 des produits hydrolysés nous indique trois fractions (Tableau 13, page 104). La fraction à fluorescence jaune-verdâtre, seule, absorbe dans le visible.

Tableau 13 - Spectre des fractions avant et après hydrolyse

Fractions		λ max. = nm			Fluorescence
F ₃ non hydrolysée		414	265	235	verte
F ₃ hydrolysée	α	-	(268)	-	beige
	β	455-425	-	237	jaune-verdâtre
	γ	-	270	-	$\pm$ verdâtre

La fraction β obtenue après l'hydrolyse n'absorbe plus à 268-270 nm et la bande à 414 nm est scindée en deux parties : 455 et 425 nm. Ceci nous laisse supposer que l'association chromophore-peptide est rompue.

L'hydrolyse enzymatique avec la Pronase ne semble pas scinder la fraction 3 en différents fragments (séparation sur Sephadex).

La réaction à la Ninhydrine sur l'hydrolysate de la fraction 3 étant nettement positive, nous avons fait la recherche des acides aminés. Une séparation par électrophorèse à haute tension (5000 volts) nous révèle que l'hydrolysate est formé de 5 bandes bien distinctes. L'électrophorèse de la fraction non hydrolysée a été également réalisée à faible tension (110 volts) et à haute tension (5000 volts), selon les méthodes décrites. Dans les deux cas nous obtenons deux bandes diffuses. La bande V₂ obtenue par Gouda (1966) est identique à notre fraction 3: elle se scindait également en deux bandes lors d'une électrophorèse à faible tension.

2.2.2. La séparation quantitative et qualitative des acides aminés est réalisée selon la méthode de Stein et Moore, 1951; Sparkmann, Stein et Moore, 1956.

Nous avons obtenu des acides aminés aliphatiques, hydroxylés, dicarboxyliques et basiques (Tableau 14, page 105).

Nous n'avons malheureusement pas effectué l'hydrolyse alcaline pour vérifier la présence éventuelle du tryptophane.

Tableau 14 - Résultats obtenus après hydrolyse de la fraction 3

Acides aminés	μ mole/l	mg/l	rapport moléculaire
lysine	474	69.2	22
sérine	229	24.0	11
glycine	148	11.0	7
ornithine	43	4.4	2
acide glutamique	21	3.1	1

3. Discussion

La fraction 3, de couleur jaune-vert à fluorescence verte, est riche en lysine, sérine et glycine. Par rapport à la masse totale appliquée sur la colonne, les 5 acides aminés constituent 52 % de la masse moléculaire. La nature du chromophore reste inconnue. Le groupe prosthétique de la molécule chromopeptidique peut être un noyau aromatique ou simplement un métal. La fraction jaune-verdâtre obtenue après chromatographie de F_3 hydrolysée absorbe dans le visible (455-425 nm) et dans l'U.V. (237 nm). Ce spectre n'est pas proche des composés flaviniques. Il est difficile d'émettre une hypothèse à son sujet. Notre pigment de nature chromopeptidique trouve une similitude avec celui de Newkirk et Hulcher (1969) et Hulcher (1968). Ces auteurs trouvent les acides aminés : lysine, sérine, thréonine et acide glutamique, dans le pigment produit par *Ps. mildenbergii*. Leur pigment est également riche en lysine.

CHAPITRE VII

RESPIRATION ET ROLE EVENTUEL DE LA PYOVERDINE

Dans ce chapitre nous décrirons les différentes chaînes respiratoires terminales chez *Ps. fluorescens*. Nous inspirant des travaux de Lenhoff et Kaplan, 1956; Lenhoff Nicholas et Kaplan, 1956; Gouda et Greppin, 1966, 1965; Favre, 1969, nous proposons un schéma concernant la participation de la pyoverdine, pigment rédox, dans le transfert d'électrons sur l'eau oxygénée.

1. Composition de la chaîne respiratoire

Plusieurs ouvrages ont été écrits sur les enzymes transporteurs d'électrons chez les bactéries (Dolin, 1961; Smith, 1961; Newton et Kamen, 1961 et Smith, 1968).

L'aspect frappant de la chaîne respiratoire terminale (CRT) des bactéries consiste dans la diversité qualitative et quantitative de ses composants. Le même organisme peut avoir différentes chaînes respiratoires. Ceci est clairement en rapport direct avec la flexibilité et l'adaptabilité des microorganismes (Kluyver et Van Niel, 1959).

Chez les bactéries aérobies la CRT comporte généralement plusieurs déshydrogénases, ubiquinone, naphtoquinone et des cytochromes de type a, b et c. L'accepteur terminal d'électrons est l'oxygène moléculaire.

Dans les mitochondries, les substrats sont oxydés au moyen de deux systèmes : NADH déshydrogénase et succinique déshydrogénase. Chez les bactéries, les électrons peuvent entrer dans la CRT par plusieurs déshydrogénases, sans intervention du NADH. Les succinate-malate-lactate et glucose-déshydrogénases ont été mises en évidence. L'activité de la glucose-déshydrogénase de *Ps. fluorescens* ne dépend pas du NAD (Hauge, 1961).

Les cytochromes de type b ont été trouvés chez *Ps. denitrificans* (Vernon, 1956). Les cytochromes c_{551} ont été obtenus à l'état cristallisé chez *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* (Ambler, 1963; Horio et coll., 1961; De Ley, 1964).

Ps. fluorescens ne semble pas posséder de cytochrome oxydase (Stanier et Gunsalus, 1953) sauf peut être dans les cultures très riches en substrats. Une cytochrome c-peroxydase dont le substrat spécifique est le cytochrome c a été découverte chez cette bactérie par Lenhoff et Kaplan (1956).

Ps. aeruginosa et *riboflavina* possèdent des cytochromes c-oxydases a , a_2 et a_3 (Arima et Oka, 1965 a et b).

Une métalloprotéine non hémunique, appelée "blue protéine" a été mise en évidence chez *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* par Ambler (1963) et Horio et al. (1961). Elle fonctionne entre le cytochrome c_{551} et la cytochrome-oxydase de *Ps. aeruginosa*. Son rôle n'est pas connu chez *Ps. fluorescens*. Une protéine semblable, appelée "Azurine", liée au cytochrome c, et réversiblement oxydable par l'oxygène, est obtenue chez *Bordetella petrusis* (Sutherland and Wilkinson, 1963; Sutherland, 1966). La protéine bleue, molécule possédant un atome de cuivre, ne joue-t-elle pas un rôle d'oxydase terminale chez *Ps. fluorescens* ? (Pongratz, 1950).

Chez *Ps. aeruginosa*, dans des conditions anaérobies, lorsque le nitrate est l'accepteur terminal d'électrons, la protéine bleue réduit la nitrate-réductase. Chez cette bactérie, la nitrate-réductase peut aussi agir avec la forme réduite de la pyocyanine, pigment phénazinique (Smith, 1968).

Pour *Ps. fluorescens*, la respiration aérobie a lieu soit sous faible tension d'oxygène, soit en présence d'une forte concentration en substrat. Sous forte tension d'oxygène la bactérie adopte une respiration flavinique. Elle se met en anaérobiose relative (Lenhoff et Kaplan, 1956).

L'accepteur terminal d'électrons peut être l' O_2 , l'eau oxygénée ou le nitrate, selon les conditions du milieu.

2. Variation qualitative et quantitative des cytochromes

La relation entre la pression partielle d' O_2 dans le milieu de culture, le contenu cytochromique et l'activité respiratoire a fait l'objet de recherches depuis fort longtemps. Il n'y a pas de relation commune à toutes les espèces. Chez *B. subtilis*, ces trois facteurs sont directement liés (Downey, 1964). Les cytochromes diminuent lorsque la tension d' O_2 baisse. Par

contre, la déficience du milieu en oxygène stimule la synthèse de cytochrome a_3 chez *E. coli*, *A. aerogenes* et *H. parainfluenza* (Moss, 1956; Smith et White, 1962).

Chez *E. coli*, *A. aerogenes* et *Ps. riboflavina*, le cytochrome a_2 est absent dans la phase logarithmique et apparaît dans la phase stationnaire (Castor et Chance, 1959; Arima et Oka, 1965 c). Les auteurs attribuent ce fait à la réduction de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu au cours de la phase stationnaire. Chez *H. parainfluenza* l'oxydase et le cytochrome c sont également plus élevés dans la phase stationnaire (White, 1963).

Nous avons vu au chapitre IV que la concentration des cytochromes chez *Ps. fluorescens* continue à augmenter au cours de la croissance, lorsque le système est achrome. Par contre, dans le système chromogène la concentration baisse très rapidement.

Chez *Ps. fluorescens* la synthèse des cytochromes est ralentie ou supprimée par l'oxygène (20 %). Dans une atmosphère d'oxygène à 1 %, le contenu en cytochromes est de 4.1 % des protéines totales, il passe à 0.3 % lorsqu'il y a 20 % d'oxygène (Lenhoff et Kaplan, 1956). Une variation identique a été observée par Rosenberger et Kogut (1958) dans les cultures continues de *Ps. fluorescens*. Dans beaucoup de cas il y a réduction de la synthèse des cytochromes lorsque le milieu est déficient en fer (Tissières, 1951; Lenhoff, Nicholas et Kaplan, 1956).

En résumé, le contenu cytochromique est sous l'influence de la tension d'oxygène, de la concentration du milieu en fer, du rapport oxygène/substrat et de la variation de la quantité de bactéries en fonction de ce rapport.

Chez *Ps. fluorescens* la respiration est du type cytochromique et peroxydasique lorsque la tension d' O_2 est faible. Elle est flavinique lorsque la tension d' O_2 augmente (Lenhoff et Kaplan, 1956). Dans ce dernier cas, une forte synthèse de diaphorase (Lenhoff et Kaplan, 1956) et de pyoverdine (Greppin et Gouda, 1972) est observée.

3. La chaîne respiratoire terminale "cytochromique" chez *Ps. fluorescens*

Lenhoff et Kaplan (1956), Lenhoff, Nicholas et Kaplan (1956) ont mis en évidence une chaîne cytochromique particulière chez cette bactérie; sous faible tension d'oxygène, l'eau oxygénée produite par l'action de NADH oxydase devient l'accepteur terminal d'électrons pour le cytochrome c (cytochrome c-peroxydase).

Le $\text{NADH} + \text{H}^+$ peut être oxydé, d'autre part, par un intermédiaire, puis par le cytochrome c. Ainsi, les deux systèmes d'oxydation de $\text{NADH} + \text{H}^+$ se réunissent et forment un système très efficace sous l'action catalytique de cytochrome c -peroxydase (C.C.P.).

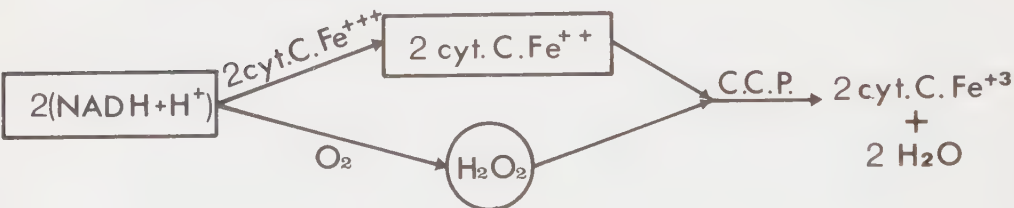
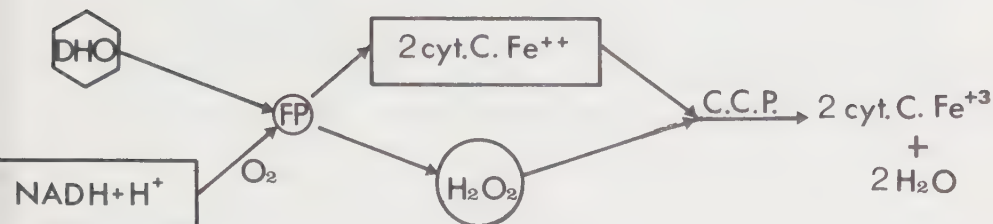


Schéma : la chaîne respiratoire "cytochromique" d'après Lenhoff et Kaplan.

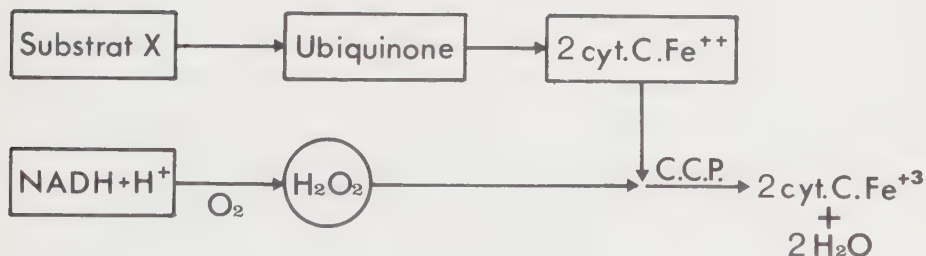
Il y a 0,5 mole d'oxygène consommé pour 1 mole de $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Ce schéma est contesté par Meyer et Wurtz (1965, 1967, 1968). Ces auteurs trouvent une consommation d'oxygène de l'ordre de 1 à 1,5 mole par mole de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et pensent qu'il y a une autre source réductrice de cytochrome c. Ils proposent le dihydro-orotate (DHO) comme substrat réducteur. Ainsi l'oxydation de DHO n'est pas liée au NAD. Plusieurs cas de déshydrogénéation non liée au NAD ont été décrits chez les pseudomonadacées (Francis, Hughes et Kornberg, 1963). Dans le schéma suivant (page 110), proposé par Meyer et Wurtz, une seule déshydrogénase flavinique, la dihydro-orotate-déshydrogénase oxyde les deux substrats, DHO et $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Schéma : la chaîne respiratoire "cytochromique" d'après Meyer et Wurtz



Kuligowska et Erecinska (1967) avancent une autre hypothèse pour la réduction du cytochrome c. L'ubiquinone serait le substrat réducteur :



D'après ces deux schémas, l'excédent du nombre de moles d' O_2 consommées correspond à l'oxydation du DHO ou du substrat X. Il faut toutefois noter que l'enzyme héminique, la catalase, est fonctionnelle chez *Ps. fluorescens*. L'eau oxygénée produite peut être scindée en eau et oxygène. Selon Meyer et Wurtz (1968), Supavej, Meyer et Wurtz (1972), l'augmentation de H_2O_2 induit la synthèse de la catalase.

En conclusion, la respiration "cytochromique" chez *Ps. fluorescens* est réalisée en présence de la catalase et de la cytochrome c -peroxydase. L'accepteur terminal d'électrons est l'eau oxygénée. L'oxygène est consommé pour l'oxydation de $NADH + H^+$ et probablement pour l'oxydation de certains substrats sous l'action des oxydases flaviniques.

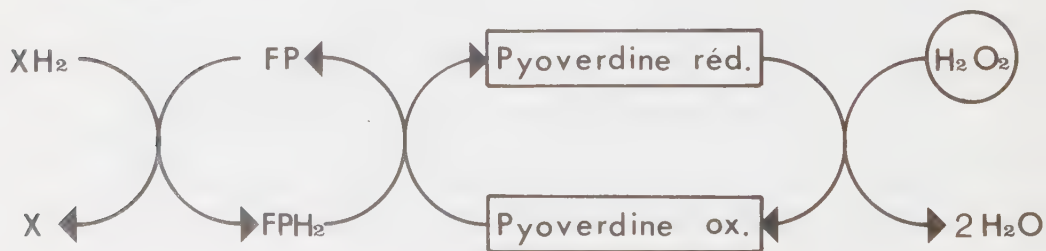
4. La chaîne respiratoire terminale "flavinique" chez *Ps. fluorescens*

Nous avons vu que l'inhibition de la synthèse des pigments hémiques (cytochrome c, catalase et cytochrome c -peroxydase) correspond à une augmentation de la quantité des diaphorases et à l'apparition de la pyoverdine. Ce pigment existe à l'état réduit ou oxydé. Gouda (1966) lui attribue un rôle dans la chaîne respiratoire et le situe entre les diaphorases et l'oxygène.

Nous avons pensé que sous forte tension d'oxygène, la bactérie se mettant en anaérobiose relative, ne doit pas utiliser totalement l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons de la CRT. L'eau oxygénée est un produit physiologique de cette bactérie, elle est produite sous faible et sous forte tension d'oxygène. H_2O_2 est toxique et doit aussi être éliminée dans les conditions où la catalase et la cytochrome c -peroxydase sont peu actives (respiration flavinique).

Dans ces conditions, il paraît acceptable, au vu des propriétés manifestées par le pigment, de postuler un rôle à la pyoverdine dans l'élimination de l'eau oxygénée, sous l'action d'une peroxydase non hémique.

L'eau oxygénée se forme chez *Ps. fluorescens* par l'oxydation des acides aminés ou d'autres substrats, en présence des oxydases flaviniques. Si la catalase est absente, l'eau oxygénée peut agir avec les céto-acides provenant de l'oxydation des acides aminés (Mahler et Cordes, 1969). Mais cette réaction n'est pas enzymatique et elle est très lente: de ce fait les céto-acides s'accumulent (Mahler et Cordes, 1969). Chez les pseudomonadales, la production de pigment jaune-vert est accompagnée d'une accumulation des céto-acides (Kolesnikova et Bekhtereva, 1970). Il pourrait donc être plausible de penser à une chaîne respiratoire "flavinique", avec la participation de la pyoverdine. Elle peut être réduite par les diaphorases.



Favre (1969) a montré *in vitro* que l'oxydation de la pyoverdine est très rapide par l'eau oxygénée et très lente par l'oxygène.

Le système enzymatique qui oxyde la pyoverdine doit être réglé par l'O₂, le fer et la concentration en substrat. Dans le système achrome les formes oxydées de la pyoverdine n'apparaissent pas. Nous avons montré que la fraction 1, seule, est synthétisée et se trouve à l'état réduit.

5. Discussion

Différents rôles métaboliques ont été attribués à la pyoverdine: Gouda (1966) la range dans l'appareil respiratoire. Greppin (1965) lui attribue le rôle d'un tampon rédox, pour protéger la bactérie lorsque la tension d'oxygène augmente.

Hulcher (1968) trouve une activité catalytique pour l'oxydation de la phénylalanine. Le pigment active la 6-phosphogluconate déshydrogénase de *Ps. mildenbergii*.

Les propriétés antibiotiques de *Ps. fluorescens* à l'égard d'*E. Coli* sont connues depuis longtemps (Waksman, 1947). Whiteside et Corpe (1969) trouvent chez *Ps. fluorescens* une protéine pigmentée à activité lytique sur l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram négatifs.

Dans notre travail, il nous a semblé que le rôle du pigment est essentiellement lié au système respiratoire (élimination d'eau oxygénée). Si la pyoverdine ne participe pas à la chaîne respiratoire, on est en droit de se demander quelle est sa fonction biologique. Est-elle simplement un sous-produit du métabolisme catabolique de la bactérie, excrété dans le milieu? Ou serait-elle la trace d'une fonction fossile, sans signification dans le contexte actuel?

D/ CONCLUSION GENERALE

1. La thèse avait pour objectif :

- . d'éclaircir le rôle de la glycine et du succinate dans la chromogénèse, en se fondant sur un travail précédemment effectué par Gouda (1966). Cet auteur attribue un effet hypochromogène à la glycine et hyperchromogène au succinate et, par ailleurs, suggère la présence de noyaux pyrroliques dans le pigment.
- . d'étudier par une méthode de séparation les caractéristiques des différentes fractions du complexe pigmentaire et les relations pouvant exister entre elles. Nous avons essayé de mettre en évidence la présence d'un précurseur, signalé par Gouda et Greppin. Dans ce but, nous avons analysé le milieu de culture dès le début de la pigmentogénèse (à partir de la dixième heure de croissance).
- . de suivre dans la biosynthèse et l'évolution du complexe pigmentaire la participation de la glycine et du succinate, au moyen de produits radioactifs.
- . de déterminer la nature du pigment.

La mise au point d'une méthode de séparation par filtration sur gel nous a permis de séparer le complexe pigmentaire, puis d'analyser la fraction 3, qui possède la couleur jaune-vert et la fluorescence verte caractéristiques des milieux chromogènes.

2. Les éléments les plus importants que nous avons pu mettre en évidence sont :

- . La participation active de la glycine à la chromogénèse. L'incorporation de la glycine-2- 14 C dans les diverses fractions, ainsi que la présence de cet acide aminé dans la partie peptidique de la fraction 3

nous confirment le rôle de cette molécule dans la biosynthèse du pigment. La glycine et le succinate sont deux molécules chromogènes et participent parallèlement à la biosynthèse du pigment. L'acide Δ -aminolévulinique, précurseur des noyaux pyrroliques et de l'acide α -cétoglutarique participe également à la formation du pigment.

- . La nature chromopeptidique de la fraction 3.

La lysine, la sérine, la glycine, l'ornithine et l'acide glutamique sont les cinq acides aminés formant la partie peptidique de la fraction 3. Cette fraction est riche en lysine.

- . La différence du métabolisme oxydatif des systèmes chromogène et achrome.

Le pouvoir oxydatif est élevé dans le système achrome. Le taux d'ATP et de cytochromes est faible en présence de la pyoverdine. La diminution des cytochromes au cours de la croissance dans le système chromogène coïncide avec une stimulation de la synthèse en pyoverdine. Dans le système achrome, la concentration en cytochromes augmente au cours de la croissance.

3. Les résultats de nos travaux nous permettent de penser que :

- . Il existe une relation, voire même une filiation, entre les fractions du complexe pigmentaire. La formation des différentes fractions est réalisée par une voie séquentielle. F_1 est le précurseur: F_2 et F_3 sont des intermédiaires et F_4 le produit final. F_2 et F_3 sont des formes physiologiquement actives et sont en équilibre chimique.
- . Le pigment est manifestement le signe d'un état physiologique: nous lui attribuons de plus un rôle dans la chaîne respiratoire terminale. Les formes rédox du complexe pigmentaire (F_2 et F_3) transfèrent les équivalents réducteurs des diaphorases à l'eau oxygénée, accepteur terminal d'électrons. L'eau oxygénée est un produit physiologique de *Ps. fluorescens* et se forme par l'oxydation de $\text{NADH} + \text{H}^+$, des acides aminés et d'autres substrats.

4. Un tel travail a nécessairement des limites. Cependant, nos résultats permettent d'entrevoir de nouvelles perspectives. Nous suggérons pour l'avenir quelques voies principales de recherche :

- . Isoler, purifier, les divers composants du complexe pigmentaire.
- . Etablir sa structure chimique.
- . Etudier la voie de la biosynthèse de la pyoverdine.
Rechercher les précurseurs de chaque partie des molécules. Cela permettrait de suivre, in vivo et in vitro, leur transformation et d'établir les relations qui existent entre elles.
Identifier les enzymes responsables de la formation de chaque fraction.
- . Etudier la perméabilité de la membrane de *Ps. fluorescens* et d'autres microorganismes pour ces pigments, aussi bien dans le sens extérieur-intérieur que dans le sens inverse.
- . Etudier la fonction de la pyoverdine.
Recherche sur la cinétique de la chaîne respiratoire terminale en l'absence des pigments héminiques.
Emploi des inhibiteurs des sites spécifiques de transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire terminale.
Inhibition de la formation de H_2O_2 dans le système chromogène et ses conséquences sur la synthèse de la pyoverdine.

E/ RESUME

Ps. fluorescens produit un complexe pigmentaire exogène, de couleur jaune-vert, à fluorescence verte : la pyoverdine.

Certaines conditions de nutrition (forte aération, faible concentration en substrat et en fer) nous ont permis d'étudier quelques aspects de la chromogénèse, en ce qui concerne la formation, l'évolution, la nature et le rôle éventuel de la pyoverdine :

- 1.- La glycine, acide aminé neutre, et l'acide succinique, acide dicarboxylique, deux molécules métaboliquement très actives, participent parallèlement à la formation de la pyoverdine. La glycine, lorsqu'elle est la seule source de carbone et d'azote, ne peut pas être métabolisée par *Ps. fluorescens*, par contre, la présence d'une deuxième source de carbone, telle que l'acide lactique ou l'acide succinique, favorise son métabolisme.
- 2.- La méthode de séparation par filtration sur gel Sephadex G-15 montre que le complexe pigmentaire est formé de cinq fractions de couleur et de fluorescence différentes (F_1 , F_2 , etc.).
- 3.- L'évolution des cinq fractions a été suivie au moyen de glycine-2- C^{14} et d'acide succinique-2,3- C^{14} . Il y a une apparition séquentielle des différentes fractions et il existe une filiation et un équilibre entre elles. Les fractions 1 et 2 caractérisent les cultures jeunes (début de la phase logarithmique de croissance). Les fractions 3, 4 et 1_a caractérisent la fin de la phase logarithmique et la phase de vieillissement. Il existe un équilibre chimique et rédox entre les formes 2 et 3 (F_2 forme réduite, F_3 forme oxydée).

4.- La fraction 1 donne naissance aux autres fractions et pourrait être nommée "précurseur" du complexe pigmentaire. Les fractions 2 et 3 ne donnent pas naissance à F_1 , mais à F_4 et F_{1_a} et sont ainsi des produits intermédiaires d'une voie séquentielle, dont le produit final serait F_4 . Ce dernier ne forme aucune autre fraction et manifeste une légère inhibition de la croissance bactérienne. En système achrome (lactate d'ammonium 15 %), seules les fractions 1, 1_a et F_4 subsistent.

5.- L'analyse de la fraction 3, de couleur jaune-vert, à fluorescence verte, révèle l'existence de cinq acides aminés (52 % de la masse moléculaire) : lysine, sérine, glycine, ornithine et acide glutamique, dans un rapport moléculaire de 22: 11: 7: 2: 1.

Le complexe pigmentaire a donc une nature chromopeptidique. Bien que la nature du chromophore nous reste inconnue, la participation de glycine, de succinate et d'acide Δ -aminolévulinique radioactifs à la biosynthèse du pigment n'est pas défavorable à l'existence d'une structure pyrrolique. Ces résultats confirment la suggestion de Lenhoff et Gouda.

6.- La pyoverdine, pigment chromopeptidique, se forme sous forte tension d'oxygène et faible concentration en substrat nutritif et en fer. Dans ces conditions, les pigments hémiques (cytochromes, cytochrome c peroxydase et catalase) sont à l'état de traces. L'apparition de la pyoverdine correspond à la diminution considérable de ces pigments tétrapyrroliques et le taux en ATP baisse également. La pyoverdine est manifestement le signe d'un état physiologique moins riche en énergie, lié à l'orientation respiratoire non cytochromique.

Ces résultats permettent, selon nos hypothèses, d'attribuer à la pyoverdine un rôle dans la chaîne respiratoire terminale (activité peroxydasique). Les formes rédox du complexe pigmentaire (F_2 , F_3) transfèrent les équivalents réducteurs des diaphorases à l'eau oxygénée, accepteur terminal d'électrons.

En effet, en l'absence de catalase et de cytochrome c peroxydase, *Ps. fluorescens* possède une chaîne respiratoire flavinique et l'eau oxygénée se forme par oxydation de $NADH + H^+$ et d'autres substrats.

S U M M A R Y

Pseudomonas fluorescens produces a yellow-green water soluble pigment: pyoverdine. Certain conditions of culture (high oxygen tension, low substrate levels and iron concentration) permitted a study of some aspects of chromogenesis which concerns the formation, evolution, nature and eventual function of pyoverdine.

1. Glycine and succinic acid were found to stimulate pigment production. *Ps. fluorescens* is not able to utilize glycine as a single source of carbon and nitrogen. But in the presence of a carbon source such as lactic acid, glycine is metabolized.
2. The separation by gel filtration on Sephadex G-15 and elution by ammonium hydroxide reveals the presence of five fractions, which are different in colour and fluorescence (F_1 , F_2 etc..). The number of fractions obtained depends on the pH, ionic strength and nature of the eluant.
3. The production of the different fractions during growth has been studied by means of glycine-2- C^{14} and succinic acid-2,3- C^{14} . The appearance of the different fractions is sequential. Fractions F_1 and F_2 are characteristic of the young cultures (at the start of log phase). Fractions F_3 , F_4 and F_{1a} appear at the end of log phase. The fractions F_2 and F_3 were found to be in redox equilibrium.

4. All fractions can be formed from F_1 and so this can be considered as a "precursor". Fractions F_2 and F_3 can be transformed in vivo into F_4 and F_{1a} only. We propose a sequential metabolic pathway for the pigment formation in which F_1 is the first product, F_2 and F_3 the intermediates and F_4 the end product.

5. The chemical analysis of F_3 , which is yellow-green in colour and green in fluorescence, revealed the presence of five amino-acids : lysine, serine, glycine, ornithine and glutamic acid, in a molar ratio: 22 : 11 : 7 : 2 : 1. This shows that a part of the fluorescent pigment is peptidic in nature (52 %). The nature of chromophore is yet unknown. But incorporation of glycine-2- C^{14} , succinic acid-2,3- C^{14} and Δ -amino-levalulinic acid-4- C^{14} in the pigment suggests a possible pyrrolic structure, which confirms Lenhoff and Gouda's hypothesis.

6. Pyoverdine is formed under high oxygen tension or under low substrate and iron concentration. In these conditions the hemic pigments (cytochrome, cytochrome c peroxydase and catalase) are negligible. Production of pyoverdine corresponded with decrease of cytochromes and ATP levels. Consequently, pigment production indicates the physiological state of bacteria, not rich in energy with non cytochrome respiratory chain. Hydrogen peroxide is a physiological product of *Ps. fluorescens*. It is also produced in the absence of cytochrome c peroxydase and catalase. In view of these findings, it is suggested that pyoverdine has a role in respiratory chain as a redox molecule to remove hydrogen peroxide.

F/ BIBLIOGRAPHIE

- ALBERT, A., 1957 - Biosynthesis of pteridine. *Biochem.J.*, 65, 124.
- AMBLER, R.P., 1963 - The purification and amino acid composition of *Pseudomonas* cytochrome c-551. *Biochem.J.*, 89, 341-349.
- ARIMA, K. et OKA, T., 1965a - Cyanide resistance in *Achromobacter*, I. Induced formation of cytochrome a_2 and its role in cyanide-resistant respiration. *J. Bacteriol.*, 90, 734-743.
- ARIMA, K. et OKA, T., 1965b - Cyanide resistance in *Achromobacter*, II. Mechanism of cyanide resistance. *J. Bacteriol.*, 90, 744-747.
- ARIMA, K. et OKA, T., 1965c - A new combination of cytochrome occurring in *Pseudomonas riboflavina*. *J. Biochem.*, 58, 320-321.
- AUDERSET, G., BAUMANN, N. et GREPPIN, H., 1966 - Morphologie de *Pseudomonas fluorescens* dans différents milieux de culture. C.R. des Séances SPNH, Genève, 1 : fasc.3, p.91.
- BAGHDIANZ, A., 1953 - Rôle du zinc sur l'apparition de la composante II du "pigment" de *Pseudomonas fluorescens* Flüggé-Migula. *Arch. Sci.*, Genève, 5, 47-48.
- BIRKHOFFER, L. et BIRKHOFFER, A., 1948 - Riboflavin, a component of "bacterial fluorescein". *Z. Naturforsch.* 3b : 136.
- BLANCHETIERE, A., 1920 - Action du *Bacillus fluorescent* liquéfiant de Flüggé sur l'asparagine en milieu chimiquement défini. *Ann. Inst. Pasteur*, 34, 392-411.
- BULEN, W.A. et LE COMTE, J.R., 1962 - Isolation and properties of a yellow-green fluorescent peptide from *Azotobacter* medium. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 9, 523-528.
- BURTON, M., CAMPBELL, J.J.R. et EAGLES, B.A., 1948 - The mineral requirements for pyocyanine production. *Canad. J. Res.*, C, 26, 15-22.
- CASTOR, L. et CHANCE, B., 1959 - Photochemical determination of the oxidases of Bacteria. *J. Biol. Chem.*, 234, 1587-1592.
- CHAKRABARTY, A.M. et ROY, S.C., 1964 - Characterization of a pigment from a pseudomonad. *Biochem. J.*, 93, 144-148.
- CHAKRABARTY, A.M. et ROY, S.C., 1964 - Effect of trace elements on the production of pigments by a pseudomonad. *Biochem. J.*, 93, 228-231.
- CHODAT, F., 1951 - Procédé chromatographique rapide pour l'analyse des pigments de *Pseudomonas fluorescens* Flüggé-Migula. Extrait des *Arch. Sci.*, Genève, 4, 188-192.
- CHODAT, F. et WASSILIEFF, N., 1951 - Contribution à la définition des formes S et R de *Pseudomonas fluorescens*. Extrait des *Arch. Sci.*, Genève, 4, 193-199.

- CHODAT, F. et YAKIMACH, M.A., 1946 - Genèse de l'antibiotique préparé par irradiation au radium du lactate d'ammonium. Extrait du C.R. des Séances SPNH, Genève, 63, 143-144.
- COHEN, G., 1967 - Le métabolisme cellulaire et sa régulation. Collection Méthodes, Paris.
- COLLINS, F.M. et LASCELLE, J., 1962 - The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 29, 531-535.
- COVAL, M., HORIO, T. et KAMEN, M., 1961 - The amino acid compositions of some bacterial haem protiens. Biochim. Biophys. Acta, 51, 246-259.
- CRUZ-CAMARILLO, R., 1968 - Complex protein-prodigiosin in *Serratia marcescens*. Nature, 218, 567-568.
- DAGLEY, S., TRUDGILL, P.W. et CALLELY, A.G., 1961 - Synthesis of cell constituents from glycine by a *Pseudomonas*. Biochem. J., 81, 623-631.
- DAVILA, C., CHARLES, P. et LEDOUX, L., 1965 - The chromatography of nucleic acid preparations on DEAE-cellulose paper. J. of Chromatog., 19, 382-395.
- DE LEY, J., 1964 - *Pseudomonas* and related genera. Ann. Rev. Microbiol., 18, 17-46.
- DETERMANN, H., 1968 - Gel chromatography, Springer-Verlag, N.Y. Inc.
- DOI, R.H. et HALVORSON, H., 1960 - Comparison of electron transport systems in vegetative cells and spores of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol., 81, 51-58.
- DOLIN, M.I., 1961 - Cytochrome-independent electron transport enzymes of bacteria. The bacteria, vol. II, Metabolism, p. 425-457. Gunsalus, I.C. et Stanier, R.Y. (eds), A.P., N.Y.
- DOLIN, M.I., 1961 - Survey of microbial electron transport mechanism. The Bacteria, vol. II, Metabolism, 319-358. Gunsalus, I.C. et Stanier, R.Y. (eds), A.P., N.Y.
- DOWNEY, R., 1964 - Vitamine K-mediated electron transfer in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 88, 904-911.
- DWORKIN, M. et NIEDERPRUEM, D.J., 1964 - Electron transport system in vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 87, 316-322.
- ELFIKI, H., 1968 - Contribution à l'étude d'un mutant achrome de la race pigmentée B₄₉ de *Pseudomonas fluorescens*. Thèse No. 1471, Université de Genève.
- ELLIOTT, R.P., 1958 - Some properties of pyoverdine, the water-soluble fluorescent pigment of the *Pseudomonads*. Appl. Microbiol., 6, 241-246.
- EL-SABEH, A., 1967 - La dissociation coloniale R et S chez *Pseudomonas fluorescens* dans ses rapports avec l'alternative respiratoire terminale. Thèse No. 1450, Université de Genève.

- FARRELL, J. et ROSE, A.H., 1967 - Temperature effects on microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 101-120.
- FAVRE, J., 1969 - Purification et séparation du pigment vert fluorescent de *Pseudomonas fluorescens*, ainsi que de son précurseur et quelques propriétés physico-chimiques de ces deux substances. Travail de diplôme de Biologie. Département de Biologie végétale, Université de Genève.
- FORREST, W.W. et WALKER, D.J., 1965 - Synthesis of reserve materials, from endogenous metabolism in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, 89, 1448-1452.
- FRANCIS, M.J.O., HUGHES, D.E. et KORNBERG, H.L., 1963 - The oxidation of L-Malate by *Pseudomonas* sp. *Biochem. J.*, 89, 430-438.
- GAJDOS, A. et GAJDOS-TOROK, M., 1969 - Biochimie des porphyrines. Masson & Cie (éd.), Paris.
- GARIBALDI, J.A., 1971 - Influence of temperature on the iron metabolism of a fluorescent *Pseudomonad*. *J. Bacteriol.*, 105, 1036-1038.
- GELOTTE, B., 1960 - Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material Sephadex. *J. Chromatog.*, 3, 330-342.
- GEORGIA, F.R. et POE, C.F., 1931 - Study of bacterial fluorescence in various media : I. Inorganic substances necessary for bacterial fluorescence. *J. Bacteriol.*, 22, 349-361.
- GESSARD, C., 1891 - Des races du *Bacillus Pyocyaneus*. *Ann. Inst. Pasteur*, 2, 65-78.
- GIRAL, F., 1936 - Sobre los Liocromos característicos del grupo de bacterias fluorescentes. *Ann. Soc. Esp. Fisi. Quím.*, 34, 667.
- GOSWAMI, S.K. et MAJUMDAR, S.K., 1970 - Water soluble fluorescent pigment production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J. Exp. Biol.*, 8, 346.
- GOUDA, S., 1966 - Etude sur le pigment de *Pseudomonas fluorescens* et de ses incidences avec le type de respiration terminale. Thèse No.1411, Université de Genève.
- GOUDA, S. et CHODAT, F., 1963 - Glyoxylate et succinate, facteurs déterminant respectivement l'hypochromie et l'hyperchromie des cultures de *Pseudomonas fluorescens*. *Pathol. Microbiol.*, 26, 655-664.
- GOUDA, S. et GREPPIN, H., 1965 - Biosynthèse pigmentaire chez *Pseudomonas fluorescens* en fonction de la concentration du substrat hydrocarboné ou aminé. *Arch. Sci. Genève*, 18, 716-721.
- GREPPIN, H., 1965 - Quelques réactions photomorphogènes chez *Pseudomonas fluorescens*, Mig. Thèse No 1397, Université de Genève.
- GREPPIN, H. et GOUDA, S., 1965 - Action de la lumière sur le pigment de *Pseudomonas fluorescens* Mig.. *Arch. Sci. Genève*, 18, 721-725.

- GREPPIN, H. et GOUDA, S., 1972 - L'alternative respiratoire chez *Pseudomonas fluorescens* en fonction de l'offre du milieu. *Saussurea*, 3, 167-176.
- HALL, D.E. et CROSBIE, G.W., 1971 - Growth of *Pseudomonas reptilivora* on glycine. *Biochem. J.*, 124, No. 2, 30 p.
- HARRISON, D.E.F. et PIRT, S.J., 1967 - The influence of dissolved oxygen concentration on the respiration and glucose metabolism of *Klebsiella aerogenes* during growth. *J. Gen. Microbiol.*, 46, 193-211.
- HAUGE, J.G., 1961 - Glucose dehydrogenation in bacteria: a comparative study. *J. Bacteriol.*, 82, 609-614.
- HEATHER, A.C., WIMPENNY, I.W.T. et HUGHES, D.E., 1967 - The ATP Pool in *E. Coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 143, 445-453.
- HORIO, T., 1958 a - Terminal oxidation system in bacteria, I. Purification of cytochromes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem., Tokyo*, 45, 195-205.
- HORIO, T., 1958 b - Terminal oxidation system in bacteria, II. Some physical and physiological properties of purified cytochromes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem., Tokyo*, 45, 267-279.
- HORIO, T., HIGASHI, T., YAMANAKA, M., MATSUBARA, H. et OKUNUKI, K., 1961 - Purification and properties of cytochrome oxydase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 236, 944-951.
- HUBERT, E.G. et POTTER, C.S., 1969 - Pigment formation in L. forms of *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.*, 55, 165-167.
- HULCHER, F.H., 1968 - Activation of 6-Phosphogluconate dehydrase by pyoverdine. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 31, 247-251.
- IWASAKI, Y., 1960 - Lactate and glucose oxidation systems in *Acetobacter suboxydans*. *Plant & Cell Physiol.*, 1, 195-205.
- IWASAKI, Y., 1960 - Components of the electron-transferring system in *Acetobacter suboxydans* and reconstruction of the lactate oxidation system. *Plant & Cell Physiol.*, 1, 207-220.
- JOHNSTONE, D.B., PFEFFER, M. et BLANCHARD, G.C., 1959 - Fluorescence of Azotobacter : I. - A comparison of the fluorescent pigments with riboflavin. *Canad. J. Microbiol.*, 5, 299-304.
- KABACK, H.R., STADTMAN, E.R., 1968 - Glycine uptake in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 243, 1390-1400.
- KAMEN, M.D. et HORIO, T., 1970 - Bacterial cytochromes. *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 673-700.
- KING, J.V., CAMPBELL, J.R. et EAGLES, B.A., 1948 - The mineral requirements for fluorescein production. *Canad. J. Res.*, 26c, 514-519.
- KLUYVER, A., VAN NIEL, C., 1959 - The microbe's contribution to biology. Harvard University Press. Cambridge, Mass.

- KOLESNIKOVA, I.G., BEKHTEREVA, M.N., 1970 - Qualitative pigment composition of the fluorescent bacteria producing keto-acids and belonging to pseudomonas genus. *Mikrobiologiya*, 39, 599-602.
- KORNBERG, H.L., 1959 - Aspects of terminal respiration in microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 13, 49-78.
- KORNBERG, H.L. et MADSEN, N.B., 1958 - The metabolism of C_2 compounds in microorganisms. Synthesis of Malate from Acetate via Glyoxylate cycle. *Biochem. J.*, 68, 549-557.
- KULIGOWSKA, E. et ERECINSKA, M., 1967 - The role of Ubiquinone in *Pseudomonas fluorescens*. *Bull. Acad. Polonaise Sci.*, 15, 323-327.
- LASCELLE, J., 1960 - The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 487-498.
- LEHNINGER, A.L., 1970 - Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. Worth Publishers, Inc.
- LENHOFF, H.M., 1963 - An inverse relationship of the effects of oxygen and iron on the production of fluorescin and cytochrome c by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature*, 199, 601-602.
- LENHOFF, H.M. et KAPLAN, N.O., 1956 - A cytochrome peroxydase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.*, 220, 967-982.
- LENHOFF, H.M., NICHOLAS, D.J.D. et KAPLAN, N.O., 1956 - Effect of oxygen, iron and molybdenum on routes of electrons transfer in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.*, 220, 983-995.
- LEPIERRE, C., 1895 - Recherches sur la fonction fluorescigène des microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, 8, 643-663.
- LOVE, S.H., HULCHER, F.H. 1964 - Green fluorescent pigment accumulated by a mutant of *Cellvibrio gilvus*. *J. Bacteriol.*, 87, 39-45.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDAL, R.J., 1951 - Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MAC NUTT, W.S., 1956 - The incorporation of the pyrimidin ring of adenine into the isoalloxazine ring of riboflavine. *J. Biol. Chem.*, 219, 365-373.
- MAHLER, H.R. et CORDES, E.H., 1969 - Biological chemistry, N.Y. Harper & Row.
- MARCHAL, J.G. et DUPAIX-LASSEUR, A., 1956 - Exposé sur la pigmentogenèse et ses caractéristiques chez *B. Ros. fluorescens* et *Pseudomonas cattleyae color* produisant un pigment rouge et violet. *Travaux de Lab. de Microb., Fac. Pharm. Nancy*, 18, 215 p.
- MARVER, H.S., TSCHUDY, D.P., PERLROTH, M.G. et COLLINS, A., 1966 - Δ -amino-levulinic-synthetase. I. Studies in liver homogenates, II. Introduction in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241, 2803 et 4323.

- MEYER, E. et WURTZ, B., 1965 - I. Mise en évidence d'un système réducteur indépendant des Pyridine-nucléotides. C.R. Soc. Biol., 159, 2046-2051.
- MEYER, E. et WURTZ, B., 1967 - II. Cellules dépourvues du système réducteur indépendant des Pyridine-nucléotides. C.R. Soc. Biol., 159, 2500-2504.
- MEYER, E. et WURTZ, B., 1967 - III. Mise en évidence d'une activité déhydro-orotate-déshydrogénasique. C.R. Soc. Biol., 161, 2056-2059.
- MEYER, E. et WURTZ, B., 1967 - IV. Rôle de la dihydroorotate-déshydrogénase. C.R. Soc. Biol., 161, 2634-2640.
- MEYER, E. et WURTZ, B., 1968 - V. Modalités de la réduction du cytochrome c. C.R. Soc. Biol., 162, 275-279.
- MEYER, E. et WURTZ, B., 1968 - VI. Régulation de l'activité catalasique. C.R. Soc. Biol., 162, 1425-1428.
- MONOD, J., 1942 - Recherche sur la croissance des cultures bactériennes. Actualités Sc. et Indust., 911. Microbiol. Paris.
- MOSS, F.J., 1956 - Adaptation of the cytochromes of *Aerobacter aerogenes* in response to environmental oxygen tension. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 34, 395-406.
- MOSS, F.J., RICKARD, P.A.D., BEECH, G.A. et BUSH, F.E., 1969 - The response by microorganisms to steady state growth in controlled concentration of oxygen and glucose. I. *Candida utilis*. Biotechnol. Bioeng., 11, 561-580.
- NAVES, R.N., 1955 - Contribution à l'étude de la pigmentation de *Pseudomonas fluorescens*. Thèse No.1244, Université de Genève.
- NEUZIL, E., VALETTE, J.P. et LABEYRIE, S., 1966 - Utilisation de la chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne pour l'étude de la chromogénèse chez *Pseudomonas aeruginosa*. Arqu. Portug. Bioquim., 10, 25-39.
- NEWKIRK, J.D. et HULCHER, F.H., 1969 - Isolation and properties of a fluorescent pigment from *Pseudomonas mildenbergii*. Arch. Biochem. Biophys., 134, 395-400.
- NEWTON, J.W., KAMEN, M.D., 1961 - Cytochrome systems in anaerobic electron transport. The bacteria, vol. II. Metabolism, 397-420, Gunsalus, I.C. et Stanier, R. Y. (eds), A.P., N.Y.
- OSAWA, S.H. et coll., 1963 - Pigment production by *Pseudomonas aeruginosa* on glutamic acid medium and gel filtration of the culture fluid filtrate. Jap. J. Microbiol., 7, 87-95.
- OSAWA, S.H. et coll., 1964 - Pigment production by *Pseudomonas aeruginosa* on glutamic acid medium. Jap. J. Microbiol., 8, 115-123.
- PALUMBO, S.A., 1972 - Role of iron and sulfur in pigment and slime formation by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 111, 430-436.

- PIRT, S.J., 1972 - Prospects and Problems in continuous flow culture of microorganisms. J. Appl. Chem. Biotechnol., 22, 55-64.
- PONGRATZ, E., 1950. - Contribution à l'étude du mécanisme de l'action fongistatique et antimélanique de la thio-urée. Rôle du cuivre dans la Nadi-réaction et modèles non-protidiques d'oxydases, de catalases et d'hydrokinases. Thèse No.1164, Université de Genève.
- PORATH, J., 1960 - Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. Biochim. Biophys. Acta., 39, 193-207.
- POUTEAU-THOUVENOT, M. et coll., 1965 - Sur la Ferrerosamine, pigment de *B. Ros. fluorescens*. Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 2085-2094.
- POUTEAU-THOUVENOT, M. et coll., 1968 - Structure chimique de la Proferrosamine B. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 222-225.
- POUTEAU-THOUVENOT, M. et coll., 1969 - Sur le rôle métabolique de la Proferrosamine A. produite par *Ps. ros. fluorescens*. Helv. Chim. Acta, 52, 2392-2398.
- RHODES, M.E., 1959 - The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. J. Gen. Microbiol., 21, 221-263.
- RHODES, M.E., 1961 - The characterization of *Pseudomonas fluorescens* with the aid of an electronic computer. J. Gen. Microbiol., 25, 331-345.
- ROSE, A.H., 1962 - Temperature relationships among microorganisms. Wallerstein Lab. Commun., 25, 5-17.
- ROSENBERGER, R.F. et KOGUT, M., 1958 - The influence of growth rate and aeration on the respiratory and cytochrome system of a fluorescent pseudomonad grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol., 19, 228-243.
- SHEMIN, D., RUSSELL, C.S. et ABRAMSKY, T., 1955 - The succinate-Glycine cycle: I. The mechanism of pyrrole synthesis. J. Biol. Chem., 215, 613-626.
- SHIBATA, K., BENSON, A.A. et CALVIN, M., 1954 - The absorption spectra of suspensions of living microorganisms. Biochim. Biophys. Acta., 15, 461-470.
- SMITH, L., 1954 - Bacterial cytochromes. Difference spectra. Arch. Biochem. Biophys., 50, 299-321.
- SMITH, L., 1961 - Cytochrome systems in aerobic electron transport. The Bacteria, vol. II, Metabolism, p. 365-393. Gunsalus, I.C. et Stanier (eds), A.P., N.Y.
- SMITH, L. et WHITE, D., 1962 - Structure of the respiratory chain system as indicated by studies with *Haemophilus parainfluenzae*. J. Biol. Chem., 237, 1337-1341.
- SMITH, L., 1968 - The respiratory chain system of Bacteria. in: Biological oxidation, p.55-122. Singer, T.P. (ed), Interscience publishers.

- SOMERS, S.T.C., 1966 - Wine tannins-isolation of condensed flavonoid pigments by gel filtration. *Nature*, 209, 368-370.
- SPARKMANN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S., 1956 - Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Fed. Proc.*, 15, 358.
- STANIER, R.Y., GUNSALUS, I.C. et GUNSALUS, C.F., 1953 - The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. II. Properties of the particulate fractions. *J. Bacteriol.*, 66, 543-553.
- STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. et DOUDOROFF, M., 1966 - The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 150-271.
- STEIN, W.H., MOORE, S., 1951 - Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 192, 663-681.
- STREHLER, B.L., 1965 - Adenosin-5'-triphosphate and Creatine-phosphate determination with Luciferase in : *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Bergmeyer, H.U.- A.P., N.Y.
- SUPAVEJ, S., MEYER, E. et WURTZ, B., 1972 - Recherches sur les variations de l'activité catalasique dans les suspensions non-proliférantes de *Pseudomonas fluorescens* (type R). I. Relation avec la lyse. *C.R. Soc. Biol. France*, 16, 703-708.
- SUTHERLAND, I.W. et WILKINSON, J.F., 1963 - Azurin : a copper protein found in *Bordetella*. *J. Gen. Microbiol.*, 30, 105-112.
- SUTHERLAND, I.W., 1966 - Production of Azurin and similar proteins. *Arch. Microbiol. Dtsch.*, 54, 350-357.
- SULLIVAN, M.X., 1905 - Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments. *J. Med. Res.*, 14, 109.
- TISSIERES, A., 1951 - A study of the cytochrome system and some other aspects of respiration of *Aerobacter aerogenes*. *Biochem. J.*, 50, 279-288.
- TISSOT, F., 1972 - Thèse en préparation. Université de Genève.
- TOTTER, J.R., MOSELEY, F.T., 1953 - Influence of concentration of iron on the production of fluorescin by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 65, 45-47.
- TURFITT, G.E., 1936 - Bacteriological and biochemical relationships in the pyocyaneus fluorescens groups. I. The chromogenic function in relation to classification. *The Biochem. J.*, 30, 1323-1328.
- TURFITT, G.E., 1937 - Bacteriological and biochemical relationships in the pyocyaneus fluorescens groups. II. Investigation on the green fluorescent pigment. *Biochem. J.*, 31, 212-218.
- TURFREIJER, A., WIBAUT, J.P. et KINGMA-BOLTJES, T.Y., 1938 - The green fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*. *Rec. des Trav. Chim. des Pays-Bas et de Belgique*, 57, 1397-1404.

- TURFREIJER, A., 1941 - Pyoverdinen de groen fluorescende Kleustoffen van *Pseudomonas fluorescens*. Thèse Université d'Amsterdam, 85 p. Brit. Abstr., 16, 16578.
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. et STAUFFER, J.F., 1964 - Manometric techniques, Burgen Publishing Co. Minneapolis.
- VERNON, L., 1956 - Bacterial cytochromes: I. Cytochrome composition of *Micrococcus denitrificans* and *Pseudomonas denitrificans*. J. Biol. Chem., 222, 1035-1044.
- VIEIRA, E. et SHAW, E., 1961 - The utilization of purines in the biosynthesis of folic acid. J. Biol. Chem., 236, 2507-2510.
- VISCONTINI, M. et BUHLER-MOOR, R., 1968 - Naturstoffe aus Mikroorganismen. II. Isolierung von L-Monapterin aus *Pseudomonas roseus fluorescens*. J.C. Marchal, 1937 und seine Konstitutionsaufklärung. Helv. Chim. Acta, 51, 1548-1554.
- WAKSMANN, S.A., 1947 - Antagonist and antibiotic substances, N.Y., Commonwealth Fund.
- WASSERMAN, A.E., 1965 - Absorption and fluorescence of watersoluble pigments produced by four species of pseudomonads. Appl. Microbiol., 13, 175-180.
- WHITE, D., 1963 - Respiratory systems in the hemin-requiring Haemophilus species. J. Bacteriol., 85, 84-96.
- WHITE, D., 1965 - Synthesis of 2-Dimethyl Vitamin K₂ and cytochrome system in Haemophilus. J. Bacteriol., 89, 299-305.
- WHITESIDE, T.L. et CORPE, W.A., 1969 - Extracellular enzymes produced by a pseudomonad sp. and their effect on cell envelopes of *Chromobacterium violaceum*. Canad. J. Microbiol., 15, 81-92.
- WIMPENNY, J.W.T., 1969 - Oxygen and carbon dioxide as regulators of microbial growth and metabolism. Symposium of the Society for Gen. Microbiol., 19, 161-197.
- WINTERS, H. et CORPE, W.A., 1971 - Polyacrylamide gel electrophoresis of exoenzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* strain W. Canad. J. Microbiol., 17, 241-248.
- WOLF, P., 1950 - Répercussion de l'asphyxie cyanhydrique sur la pigmentation de *Pseudomonas fluorescens*. Thèse No. 1157, Université de Genève.

